UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Utilização e caracterização de anticorpos para identificação de ligandos proteicos em pinturas de cavalete

Ana Filipa do Rosário Branco

Orientação: Prof.ª Doutora Ana Teresa Caldeira

Prof. Doutor António Candeias

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

“Matar o sonho é matarmo-nos.
É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de
realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso”

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Edite e Paulo

Esta dissertação teve o apoio do projeto PTDC/EAT-HAT/115692/2009, cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do programa COMPETE

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar quero agradecer à Profª. Doutora Ana Teresa Cadeira e ao Prof. Doutor António Candeias, pela orientação, disponibilidade, simpatia, compreensão e boa disposição sempre demonstrada.

Ao Prof. Doutor Amin Karmali, à Engenheira Magda Semedo, à Doutora Sónia Martins e à Dr.ª Maria de Fátima Candeias, pelo apoio no decorrer deste trabalho e pelos conhecimentos que foram transmitidos.

Um especial agradecimento à Cátia Salvador, Tânia Rosado, Marina González, Mara Silva, Ricardo Vieira, Ana Fialho, Patrícia Nunes, Sílvia Arantes e à D. Anabela Cabaça, um obrigado por todos os momentos, pelo ombro amigo, boa disposição, compreensão e disponibilidade sempre prestada.

À D. Maria Helena Carvalho e à D. Esperança Alves pelo apoio e atenção que sempre demonstraram no decorrer do trabalho.

Aos restantes amigos, longe ou perto, vocês foram indispensáveis. Patrícia, Ana Luísa, Vanessa, Eva, Isabel, Ana Carolina, Catarina, Helena, Vasques, Pedro, Ricardo, Luís, Margarida, Teresa, Mónica, Sali, a todos um muito obrigada pela paciência e pelo apoio sempre demonstrado.

Aos meus familiares, em especial à Teresa e à Rita, apesar da distância estão sempre comigo.

Aos meus Pais, pelo carinho e por todo o amor, apoio e compreensão, por nunca me deixarem desistir e por acreditarem. Pelo esforço que fazem e por todas as oportunidades que me deram. Por estarem sempre lá.

Resumo

Devido à relevância das proteínas como componentes das pinturas de cavalete, o seu reconhecimento é de grande interesse para caracterizar a técnica artística e para fins de conservação e restauro. Infelizmente, a degradação dos materiais originais, a coexistência de diferentes proteínas e as matrizes complexas das pinturas, tornam esta tarefa particularmente difícil de ser conseguida.

Neste trabalho selecionaram-se aglutinantes proteicos (colas) comummente utilizados nas pinturas de cavalete, testaram-se anticorpos para o reconhecimento das colas de coelho e desenvolveram-se ensaios em microamostras de provetes de camada de preparação para pintura de cavalete.

As colas são constituídas maioritariamente por proteínas, e os resultados mostram a presença de proteínas distintas, consoante a origem da cola animal. Quatro dos dez anticorpos testados reconheceram a cola de pele de coelho e o anticorpo 3.14 permitiu um reconhecimento seletivo deste aglutinante nas provetes, abrindo a possibilidade de se poder vir a utilizar este anticorpo em amostras reais.

Palavras-chave: aglutinante, materiais proteicos, anticorpo, especificidade, património cultural

Utilisation and characterisation of antibodies to identify proteic binders in easel paintings

Abstract

Due to the relevance of proteins as components in easel paintings, its recognition is of great interest to characterize the artistic technique and for conservation and restauration purposes. Unfortunately, the degradation of materials, the coexistence of different proteins and the complex matrices in paintings make this a particularly difficult task to achieve.

In this work we selected proteic binders (glues) commonly used in easel paintings, test antibodies for the recognition of rabbit fur glue and developed assays in microsamples of specimens of preparation layer to easel paintings.

The glues are constituted mostly by proteins and the results show the presence of distinct proteins according to the animal from which the glue origins. Four of the ten antibodies tested recognized the rabbit fur glue, and the antibody 3.14 allowed a selective recognition of the binder in microsamples, allowing the possibility of being able to use this antibody in real samples.

Keywords: binder, proteic materials, antibodies, specificity, cultural heritage

Índice

Resumo I

Abstract III

Índice V

Índice de Tabelas IX

Índice de Figuras XI

Abreviaturas XV

Unidades de medida XVII

1. NOTA PRÉVIA 1

1.1. Problemática, Objetivos e Metodologias de Trabalho 3

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7

2.1. Pinturas de cavalete e seus constituintes 9

2.2. Aglutinantes proteicos 11

2.2.1. Albumina e Ovalbumina 12

2.2.2. Caseína 13

2.2.3. Colagénio 14

2.3. Ensaios imunológicos 15

2.4. Anticorpos e a sua produção 16

2.4.1. Tecnologia de Hibridomas 18

3. METODOLOGIA 21

3.1. Caracterização das colas 23

3.1.1. Determinação do conteúdo proteico 23

3.1.2. Determinação do conteúdo glucídico 23

3.1.3. Determinação do conteúdo lipídico 24

3.1.4. Separação eletroforética das colas 25

3.1.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes 25

3.1.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 26

3.1.5. Estudo da composição das colas por técnicas espetroscópicas e cromatográficas 27

3.1.5.1. Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 27

3.1.5.2. Espetroscopia μ-Raman 27

3.1.5.3. Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) 28

3.2. Purificação das proteínas das colas 28

3.2.1. Separação do conteúdo por cromatografia de troca iónica 29

3.2.2. Separação do conteúdo por cromatografia de exclusão molecular 29

3.3. Análise dos anticorpos produzidos 30

3.3.1. Deteção e quantificação por ELISA 30

3.3.2. Determinação da especificidade dos anticorpos por *Western Blotting* 31

3.4. Reconhecimento das colas animais em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete 32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33

4.1. Caracterização das colas 35

4.1.1. Determinação do conteúdo orgânico das colas animais 35

4.1.2. Análise de proteínas presentes nas colas animais por métodos eletroforéticos 36

4.1.3. Análise de proteínas presentes nas colas animais por métodos cromatográficos ... 38

4.1.4. Análise das colas animais por métodos não destrutivos 40

4.2. Fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais 43

4.3. Análise dos anticorpos produzidos 49

4.3.1 Reconhecimento da cola de pele de coelho pelos anticorpos 49

4.3.2. Especificidade dos anticorpos para a cola animal de pele de coelho 50

4.3.3. Especificidade do anticorpo 3.14 para frações proteicas da cola de pele de coelho 52

4.3.4. Ensaios de reconhecimento de colas animais em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete 54

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

7. ANEXOS 67

Anexo A- Suporte às metodologias aplicadas A.1

I-1.Técnicas Eletroforéticas A.1

I-1.1. PAGE- Nativa A.2

I-1.2. SDS- PAGE A.2

I-2. Técnicas Espetroscópicas A.3

I-2.1. FTIR-ATR A.3

I-2.2. μ-Raman A.4

I-3. Técnicas Cromatográficas A.5

I-3.1. HPLC A.5

I-3.2. IEC A.6

I-3.3. SEC A.7

I-4. Técnicas Imunológicas A.9

I-4.1. ELISA A.9

I-4.2. *Western Blotting* A.10

Anexo B- Soluções B.1

Anexo C- Curvas de Calibração para determinação do conteúdo proteico, glucídico e lipídico das colas animais e das frações obtidas por IEC e SEC C.1

Anexo D- Curvas de Calibração para o estudo da composição das colas animais por HPLC D.1

Anexo E- Curvas de Calibração para determinação da MM proteica nas frações SEC E.1

Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição dos géis de concentração e resolução para PAGE- Nativa. ... 26

Tabela 2- Composição dos géis de concentração e resolução para SDS- PAGE. 27

Tabela 3- Massas moleculares médias dos compostos proteicos e glucídicos presentes nos aglutinantes, determinados por cromatografia de exclusão molecular num sistema HPLC. 39

Tabela 4- Percentagem proteica e polissacarídica recolhida após o fracionamento das colas na coluna de IEC. 45

Tabela 5- Percentagens de recuperação de proteína e polissacárido após fracionamento das colas animais por SEC. 48

Tabela 6- Massas moleculares das frações proteicas purificadas presentes nos aglutinantes, obtidas por SEC. 48

Tabela 7- Atividade do anticorpo na determinação do reconhecimento da cola animal de pele de coelho e respetiva classe. 50

Tabela 8- Atividade do anticorpo para determinação da especificidade dos anticorpos produzidos. 51

Tabela 9- Atividade do anticorpo 3.14 na determinação do reconhecimento das frações obtidas por IEC e SEC. 52

Tabela 10- Atividade dos anticorpos selecionados, indicadora do reconhecimento destes às provetes. 54

Índice de Figuras

Figura 1- Exemplos meramente ilustrativos de tipos de pinturas. (a)- Pintura mural "Ermida de St. Aleixo", Montemor-o-Novo, com danos estéticos e estruturais visíveis (b)- Pintura de Cavalete "Madonna and Child with Sts Catherine and Barbara", Bernardino Luini, Szépmûvészeti Museum, Budapest. 9

Figura 2- Estratigrafia (a) e esquema ilustrativo (b) da constituição de uma pintura de cavalete. 10

Figura 3- Exemplos de aglutinantes proteicos em estado sólido. (a)- Cola animal de pele de coelho, (b)- Cola animal de coelho, (c)- Cola animal de pele de carneiro. 12

Figura 4- Colas extraídas de animais, em estado líquido. As colas em estado sólido foram aquecidas e, após o arrefecimento, verifica-se o aspeto gelatinoso. 15

Figura 5- Estrutura geral de um anticorpo. C_L- região constante da cadeia leve, $C_{H1,2,3}$- regiões constantes da cadeia pesada, V_L- região variável da cadeia leve, V_H- região variável da cadeia pesada, S-S- ligações dissulfeto (adaptado S. University, 2010)… 17

Figura 6- Esquema representativo da Tecnologia de Hibridomas para produção de anticorpos específicos contra antigénios de interesse (adaptado Pandey, 2010 e Tyagi et al., 2011). 19

Figura 7- Placa de 96 poços para realizar ensaios ELISA. Os poços com coloração amarela indicam os poços onde ocorreu reconhecimento do antigénio pelo anticorpo. 31

Figura 8- Provetes utilizadas nos ensaios para obtenção das amostras proteicas. A- Provete de cola de pele de coelho, B- Provete de cola de coelho, C- Provete de cola de carneiro. 32

Figura 9- Composição orgânica, em percentagem (%), dos aglutinantes em estudo. (a)- Cola de Pele de Coelho, (b)- Cola de Coelho, (c)- Cola de Pele de Carneiro, (d)- Cola de Pescada. 35

Figura 10- Eletroforetograma PAGE- Nativa das colas animais. M_1- Padrão comercial; M_2- BSA; C_1- Cola de Pele de Coelho; C_2- Cola de Coelho; C_3- Cola de Pele de Carneiro; C_4- Cola de Pescada. 36

Figura 11- Eletroforetograma SDS- PAGE das colas animais. M_1- Padrão comercial; M_2- BSA; M_3- Ovalbumina; C_1- Cola de Pele de Coelho; C_2- Cola de Coelho; C_3- Cola de Pele de Carneiro; C_4- Cola de Pescada 37

Figura 12- Análise HPLC dos aglutinantes utilizando detetores de RI e UV acoplados com SEC (MM- massa molecular, kDa). A- cola animal de pele de coelho, B- cola animal de coelho, C- cola animal de pele de carneiro, D- cola animal de pescada. 38

Figura 13- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pele de coelho. 40

Figura 14- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de coelho..... 41

Figura 15- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pele de carneiro..... 41

Figura 16- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pescada.. 41

Figura 17- Fracionamento por IEC da cola animal de pele de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente. 43

Figura 18- Fracionamento por IEC da cola animal de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente. 44

Figura 19- Fracionamento por IEC da cola animal de pele de carneiro e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente. 44

Figura 20- Fracionamento por IEC da cola animal pescada e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I- fração proteica recolhida durante o gradiente. 45

Figura 21- Fracionamento por SEC da cola animal de pele de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII- frações purificadas selecionadas. 46

Figura 22- Fracionamento por SEC da cola animal de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas..... 46

Figura 23- Fracionamento por SEC da cola animal de pele de carneiro e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas..... 477

Figura 24- Fracionamento por SEC da cola animal de pescada e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas..... 47

Figura 25- Especificidade do anticorpo 3.14 às frações proteicas por IEC da cola de pele de coelho. (a)- eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes (4%), (b)- membrana de nitrocelulose após incubação com o anticorpo e revelação, C_1- cola de pele de coelho, F_1- fração antes da aplicação do gradiente KCl, I e II- frações IEC, M- BSA. 53

Figura 26- Módulo FTIR- ATR utilizado na análise espetroscópica das colas animais para estudo da sua composição. A.4

Figura 27- Espetrómetro utilizada na análise da composição das colas animais pela técnica de espetroscopia µ-Raman.....A.4

Figura 28- Equipamento HPLC, composto pela bomba com injetor *loop*, detetor de UV e detetor de RI, utilizada na análise da composição das colas animais. A.6

Figura 29- Coluna adaptada para fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais por IEC. A.7

Figura 30- Esquema ilustrativo da separação de moléculas de diferentes dimensões por cromatografia de exclusão. As moléculas de grandes dimensões são eluídas inicialmente no volume de exclusão da coluna (adaptado Wilson & Walker, 2010)....A.8

Figura 31- Coluna utilizada no fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais por SEC. A.8

Figura 32- Esquema ilustrativo do método ELISA indireto, utilizado na análise dos anticorpos produzidos para a cola de pele de coelho. A- o antigénio (aglutinantes ou amostra de provete) é colocada no poço da placa, diluído em tampão; B- adição do anticorpo produzido para o antigénio em estudo; C- adição de um segundo anticorpo, específico para o primeiro, conjugado com um enzima; D- adição do substrato p-nPP que vai reagir com o enzima formando um produto de coloração amarelo (adaptado Cartechini et al., 2010). A.10

Figura 33- Esquema ilustrativo da montagem do sistema de transferência por *electroblotting*. (adaptado Wilson & Walker, 2010).....A.11

Figura 34- Curva de calibração utilizando BSA como padrão para quantificação de proteínas. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas…B.1

Figura 35- Curva de calibração utilizando a glucose como padrão, para quantificação de glúcidos. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas B.1

Figura 36- Curva de calibração utilizando colesterol como padrão, para quantificação de lípidos. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas .... ….B.2

Figura 37- Perfil de UV dos compostos proteicos para os padrões proteicos urease, BSA, ovalbumina e tripsina com MM de 480, 66, 45 e 20,1 kDa, respetivamente, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC. C.1

Figura 38- Curva de calibração com os padrões proteicos BSA, ovalbumina e tripsina para análise por HPLC..... C.1

Figura 39- Perfil de RI dos compostos polietilenoglicol (PEG) com MM de 20, 6, 3 e 1.5 kDa, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC..... C.2

Figura 40- Curva de calibração de padrões PEG para análise por HPLC. C.2

Figura 41- Perfil cromatográfico dos compostos proteicos BSA, ovalbumina, tripsina e citocromo c analisando por SEC utilizado *Sephacryl S-100* como fase estacionária. D.1

Figura 42- Curva de calibração com padrões de BSA, Ovalbumina, Tripsina e Citocromo C, para determinação de MM na técnica de SEC. D.1

Abreviaturas

A- Área

Abs- Absorvância

APS- Persulfato de amónio, agente polimerizador de géis de poliacrilamida (do inglês *ammonium persulfate*)

BCIP- Substrato colorimétrico, 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato

BSA- Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

DEAE- Dietilaminoetanol (do inglês *Diethylaminoethanol*)

DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

ELISA- Teste imunológico (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

FTIR-ATR- Espetroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (do inglês *Fourier Transform Infrared with Attenuated Total Reflectance*)

GC- MS- Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (do ingles *Gas chromatography–mass spectrometry*)

HPLC- Cromatografia líquida de elevada eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IEC- Cromatografia de troca iónica (do inglês *Ion Exchange Chromatography*)

IFM- Microscopia de imunofluorescência (do inglês *Immunofluorescence Microscopy*)

IR- Infravermelho (do inglês *Infrared*)

Ig- Imunoglobulina

Mab- Anticorpo monoclonal (do inglês *Monoclonal Antibody*)

MALDI- TOF- Espetrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight*)

MM- Massa molecular

PAGE- Nativa- Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (do inglês *Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*)

PBS- Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate- Buffered Saline*)

PBS-T- Tampão fosfato salino com o detergente Tween 20

PEG- Polietilenoglicol (do inglês *Polyethylene glycol*)

p-NPP- Para-nitrofenilfosfato, substrato colorimétrico do ELISA (do inglês, *p-Nitrophenyl Phosphate*)

SDS- Dodecil sulfato de sódio, detergente aniónico para desnaturar proteínas (do inglês *sodium dodecyl sulphate*)

SEC- Cromatografia de exclusão molecular (do inglês *Size Exclusion Chromatography*)

TEMED- N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina, catalisador do gel de poliacrilamida (do inglês *N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine*)

TBS- Tampão salino Tris (do inglês *Tris-buffered saline*)

Tris- Composto orgânico Tris(hidroximetil)aminometano

TTBS- Tampão salino Tris com o detergente Tween 20

U.V.- Ultravioleta (do inglês, *ultraviolet*)

Vis- Visível (do inglês, visible)

μ-Raman- Espetroscopia Micro- Raman

Unidades de medida

%- Percentagem

°C- Graus Celsius

Da, kDa- Dalton, Quilodalton

h, min, s- Horas, minutos, segundos

kg, mg, µg- Quilograma, miligrama, micrograma

m, cm, mm, nm, µm- Metro, centímetro, milímetro, nanómetro, micrómetro

M, mM- Molar, milimolar

mA- Miliampere

L, mL, µL- Litro, mililitro, microlitro

rpm- Rotações por minuto

V- Volts

W, mW- Watt, megawatt

1. NOTA PRÉVIA

1.1. Problemática, Objetivos e Metodologias de Trabalho

Inúmeras obras de arte, tais como pinturas, cerâmicas, têxteis, estátuas, vitrais, entre outros, possuem uma elevada importância na herança cultural, sendo por isso essencial a sua conservação. Os materiais, orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, utilizados no fabrico destes objetos estão suscetíveis a fatores de deterioração. Assim é crucial a identificação e perceção dos processos de degradação de forma a preservar estes materiais.

As pinturas, quer sejam murais ou de cavalete, contêm uma variedade de constituintes que proporcionam vários nichos ecológicos favoráveis ao crescimento de espécies microbiológicas. Nas pinturas de cavalete, os materiais de suporte (papel de celulose, tela, madeira) e os aditivos (colas animais e vegetais, emulsionantes, agentes espessantes) são facilmente degradados pelos microrganismos. O seu crescimento nas pinturas pode causar danos estéticos e estruturais, tais como descoloração dos pigmentos, aparecimento de manchas ou biofilmes à superfície, fissuras, desintegração e degradação dos polímeros de suporte e dos adesivos, resultando no desprendimento das camadas de tinta do suporte. Por outro lado, a correta identificação dos materiais, nomeadamente a caracterização dos materiais proteicos, é um passo importante para compreender a técnica utilizada pelo artista, fornecendo ainda informações relevantes para intervenções de conservação e restauro. A identificação das proteínas tem sido uma questão difícil de resolver, devido à degradação que estes materiais vão sofrendo ao longo do tempo. Existem alguns estudos de identificação dos constituintes proteicos nas pinturas utilizando técnicas cromatográficas, espetrometria de massa e espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Esta última abordagem permite a identificação de materiais proteicos em pinturas, contudo estas técnicas podem produzir sinais difíceis de interpretar devido às matrizes complexas das proteínas e à presença de compostos orgânicos e inorgânicos que podem mascarar os sinais. Para além disso, não

permitem discriminar a origem animal das colas. Recentemente estão mencionadas estratégias de proteómica, porém, apesar destas metodologias permitirem a identificação de materiais proteicos em obras de arte com alta sensibilidade, trata-se de processos dispendiosos a nível de tempo, equipamento e pessoal experiente. Os ensaios imunoenzimáticos oferecem vantagens únicas em relação a outras abordagens analíticas utilizadas. Na verdade, são metodologias muito sensíveis e específicas, sendo seletivas no que diz respeito à origem biológica, e capazes de resolver misturas complexas de proteínas.

A produção de anticorpos monoclonais (mAbs), para uso em estudos de património tem um potencial enorme. Alguns estudos têm sido desenvolvidos para a albumina, ovalbumina e caseína no entanto a existência de anticorpos específicos para colas animais é bastante reduzida.

Devido à relevância das proteínas como materiais de pintura, o seu reconhecimento é de grande interesse para caracterizar a técnica artística e para fins de conservação e restauro. Infelizmente, a degradação dos materiais originais, a coexistência de diferentes proteínas de contaminação do meio ambiente, para além de possíveis materiais usados em restauros precedentes, torna esta tarefa particularmente difícil de ser conseguida.

Assim, os principais objetivos deste estudo são:

- Caracterizar e purificar quatro colas animais, muito utilizadas em pinturas de cavalete;
- Testar o reconhecimento e seletividade de anticorpos produzidos especificamente para cola de pele de coelho;
- Desenvolver ensaios que permitam aplicar os anticorpos selecionados em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete.

São ainda objetivos específicos:

- Determinar o conteúdo proteico, glucídico e lipídico de cada uma das colas animais;
- Caracterizar as colas animais por métodos espectroscópicos;
- Separar e fracionar o conteúdo das colas animais por técnicas cromatográficas;
- Testar o reconhecimento dos anticorpos produzidos para a cola animal de pele de coelho;
- Testar o reconhecimento dos anticorpos selecionados em frações cromatográficas das colas e confirmar esse reconhecimento por *Western Blotting*;
- Caracterizar alguns anticorpos produzidos, para a cola de pele de coelho, relativamente à sua classe;
- Testar a especificidade dos anticorpos para a cola de pele de coelho, quando comparada com outros tipos de aglutinantes;
- Testar os anticorpos específicos em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete.

.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pinturas de cavalete e seus constituintes

A pintura é uma prática que tem vindo a acompanhar o ser humano ao longo da história, sendo esta uma forma de expressão de arte bastante utilizada desde a antiguidade. Desde as pinturas rupestres (pintura de pré- história em cavernas e rochas) à pintura contemporânea, as técnicas e todos os materiais associados têm vindo a evoluir.

Podem enumerar-se dois tipos de pintura, a pintura mural ou de suporte imóvel, e a pintura de cavalete ou de suporte móvel. Na pintura mural (Figura 1-a), os materiais inorgânicos são aplicados sobre uma parede com base de argamassa, podendo ser executada *a fresco* ou *a secco*.

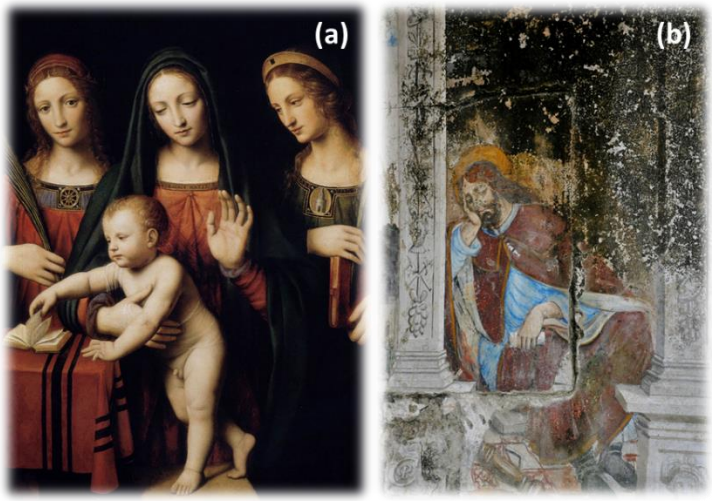

Figura 1- Exemplos meramente ilustrativos de tipos de pinturas. (a)- Pintura mural "Ermida de St. Aleixo", Montemor-o-Novo, com danos estéticos e estruturais visíveis (b)- Pintura de Cavalete "Madonna and Child with Sts Catherine and Barbara", Bernardino Luini, Szépmûvészeti Museum, Budapest.

A pintura de cavalete (Figura 1-b), desde o Renascimento até ao século XX, tem vindo a ser mais notória, pelo que começou a ser preferida à pintura mural.

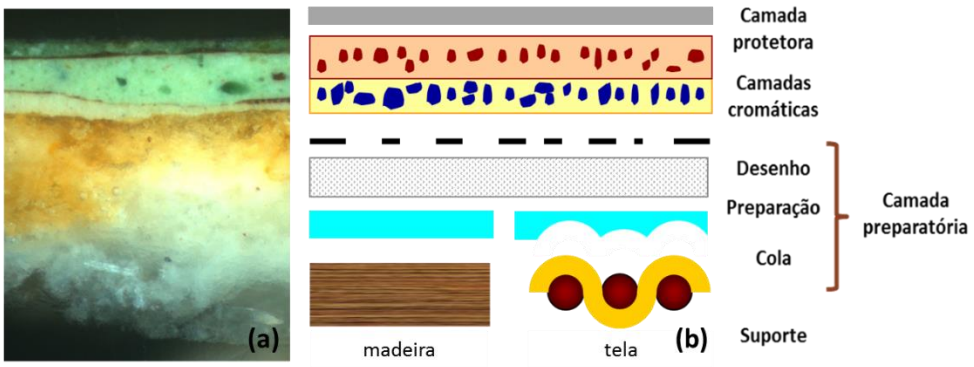

Figura 2- Estratigrafia (a) e esquema ilustrativo (b) da constituição de uma pintura de cavalete.

As pinturas de cavalete são constituídas por vários estratos (Figura 2) aplicadas num suporte móvel, madeira ou tela. O primeiro estrato do suporte é a camada preparatória, constituída por um aglutinante e uma carga sólida inerte (sulfato de cálcio ou carbonato de cálcio) onde a fixação é efetuada pelo uso de um adesivo, com o intuito de obter uma superfície uniforme para a aplicação das restantes camadas. De seguida são aplicadas as camadas cromáticas, constituídas por pigmentos ou corantes em suspensão com o aglutinante, de forma a dar adesão e coesão às partículas, distribuindo-as de forma homogénea pela superfície. Por último, é aplicada a camada protetora, uma película fina e transparente, normalmente um verniz feito à base de resinas. A finalidade desta camada é conceder brilho e proteção contra os agentes ambientais, protegendo da possível degradação (Hurt & Ocon; Johnson & Bennett, 2000; Stuart, 2007).

Sendo vários os constituintes destas pinturas, os aglutinantes e os pigmentos são os de maior importância.

Os pigmentos são substâncias constituídas por partículas muito finas e coloridas que ao serem misturadas com os aglutinantes formam uma pasta colorida, passível de ser utilizada para representação gráfica. Os vários pigmentos podem ser classificados segundo a sua origem (pimentos naturais e pigmentos sintéticos), a composição química (pigmentos orgânicos e pigmentos inorgânicos), e de acordo com a sua cor.

Existe uma enorme variedade de pigmentos, sendo a sua grande maioria carbonatos, sulfatos ou óxidos de metais de transição (Stuart, 2007).

O aglutinante, adesivo, ou cola, é outro componente muito importante das pinturas de cavalete. Muitos compostos têm vindo a ser utilizados como aglutinantes, podendo ser divididos de acordo com a sua composição: unicamente proteínas (colas animais e de pescada, clara de ovo), quantidades substanciais de proteínas (gema de ovo, leite), carbohidratos (gomas de plantas), resinas e ceras (Dorge & Howlett, 1998; Stuart, 2007). Os aglutinantes desempenham diversas funções, tais como promover a distribuição uniforme dos pigmentos sob a superfície, preencher o espaço existente entre os elementos e proporcionar uma forte ligação entre eles (Rivers & Umney, 2003). Estes possuem como características a transparência e ausência de cor para que não ocorram alterações nas propriedades dos pigmentos, e capacidade de adesão e coesão para facilitar a aplicação dos pigmentos na superfície. Dependendo do tipo de aglutinante, a estabilidade a fatores externos e a capacidade hidrofóbica é variável, contudo quanto maior estas características maior a resistência da pintura (Ahmed & Kolisis, 2012; Ciferri, 1999).

2.2. Aglutinantes proteicos

Ao longo da história inúmeros produtos naturais têm sido utilizados em obras de arte sendo a mais comum, a aplicação de materiais orgânicos como agentes aglutinantes (Arslanoglu et al., 2010). Um exemplo desses materiais orgânicos são as proteínas, constituintes importantes de alguns aglutinantes como clara e gema de ovo, caseína, e colas animais e de pescada (Arslanoglu et al., 2010; Cartechini et al., 2010; Sciutto et al., 2011; Sciutto et al., 2012).

As proteínas são macromoléculas abundantes nos sistemas biológicos, encontrando-se envolvidas praticamente em todas as propriedades estruturais e

funcionais dos seres vivos, tais como estrutura (colagénio), proteção (imunoglobulinas), catálise (enzimas), entre outras (Wilson & Walker, 2010).

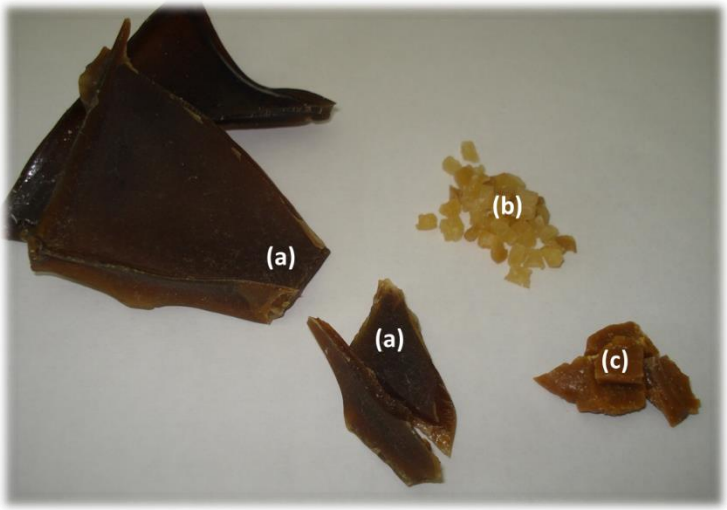

Figura 3- Exemplos de aglutinantes proteicos em estado sólido. (a)- Cola animal de pele de coelho, (b)- Cola animal de coelho, (c)- Cola animal de pele de carneiro.

Alguns dos aglutinantes usados em bens são constituídos essencialmente por proteínas da clara e gema de ovo, ovalbumina e albumina respetivamente, do leite, onde a sua constituição proteica é maioritariamente caseína; e de colas animais onde a proteína em causa é o colagénio (Arslanoglu et al., 2010; Cartechini et al., 2010; Sciutto et al., 2011; Sciutto et al., 2012).

2.2.1. Albumina e Ovalbumina

O ovo é um dos materiais mais comumente utilizados nas pinturas, como fixador e consolidante dos pigmentos, constituído por proteínas denominadas albumina. Estas são proteínas globulares e constituídas por duas frações, uma hidrofílica orientada para o exterior, e outra hidrofóbica orientada para o interior da estrutura da proteína (Colombini & Modugno, 2004).

Os dois componentes do ovo, gema e clara, não apresentam diferenças significativas em termos de aminoácidos presentes na sua constituição. Estes dois componentes contêm quantidades moderadas de asparagina, glutamina e leucina, aminoácidos que permitem distingui-los dos restantes. A clara de ovo possui como principal componente a ovalbumina, uma glicoproteína, enquanto a gema de ovo para além das proteínas em comum com a clara de ovo, contém ainda lípidos e lecitina, um fosfolípido que atua como emulsionante (Colombini & Modugno, 2004; Dorge & Howlett, 1998).

Para ser utilizado nas pinturas, a gema de ovo é diluída em água e misturada com os pigmentos. Os componentes lipídicos que constituem este tipo de aglutinante permitem que, durante o processo de secagem, se forme um filme elástico e resistente. A sua permeabilidade e solubilidade, tal como esperado, diminuem à medida que envelhece, dada a desnaturação das proteínas (Colombini & Modugno, 2004; Dorge & Howlett, 1998).

2.2.2. Caseína

O leite é uma alternativa utilizada pelos artistas para substituição do ovo como aglutinante. Este é uma emulsão aquosa de proteínas e lípidos, sendo a proteína maioritária a caseína (Colombini & Modugno, 2004).

A caseína é uma fosfoproteína que pertence ao grupo de proteínas encontradas no leite fresco, representando cerca de 80% das proteínas totais. Consoante o tratamento aplicado ao leite pode obter-se vários tipos de caseína: o tratamento de coagulação pode ser enzimático, utilizando a enzima renina, obtendo-se a para- caseína ou caseína de coalho enquanto o tratamento pela redução de pH, utilizando ácidos, origina a caseína ácida (Colombini & Modugno, 2004; Dorge & Howlett, 1998).

A composição e as propriedades da caseína dependem da forma de produção, sendo que as reações de degradação deste aglutinante podem também variar. A caseína é um forte aglutinante natural, pelo que a aplicação deve ser controlada, pois o tipo de filme obtido em qualquer um dos tipos de caseína é quebradiço, levando a danos estruturais rapidamente (Dorge & Howlett, 1998).

2.2.3. Colagénio

As colas derivadas de animais são provavelmente o aglutinante mais utilizado historicamente, podendo confirmar-se em estudos que mostram a utilização destes aglutinantes em diversas pinturas no antigo Egipto (Dorge & Howlett, 1998).

Os aglutinantes animais são extraídos por ebulição de vários tecidos conetivos como osso, pele, tendões e outras partes cartilaginosas de animais como coelho, cabra e carneiro, podendo também encontrar-se em algumas espécies de peixe. O principal componente proteico que constitui este aglutinante é o colagénio, uma proteína fibrosa caracterizada por cadeias polipeptídicas de três aminoácidos maioritários (glicina, prolina e hidroxiprolina). No total, existem descritos cinco tipos de colagénio em animais vertebrados, contudo a sua composição em aminoácidos é bastante semelhante (Dorge & Howlett, 1998; Schellmann, 2007; Sciutto et al., 2012).

O colagénio apresenta vantagens quando comparado com os restantes aglutinantes, pois possui capacidade de solubilizar em água quente. Na sua forma nativa o colagénio é insolúvel, contudo sob aquecimento, por desnaturação das ligações de hidrogénio das cadeias de aminoácidos, forma-se uma gelatina que pode ser posteriormente utilizada nas pinturas. Esta gelatina pode ser caracterizada como a fase mais pura da produção da cola animal (Colombini & Modugno, 2004; Dorge & Howlett, 1998; Schellmann, 2007).

Figura 4- Colas extraídas de animais, em estado líquido. As colas em estado sólido foram aquecidas e, após o arrefecimento, verifica-se o aspeto gelatinoso.

As colas comerciais que existem atualmente apresentam inúmeros aditivos, necessitando de tratamento com uma solução ácida ou básica para a solubilização do colagénio (Dorge & Howlett, 1998; Schellmann, 2007).

2.3. Ensaios imunológicos

A caracterização e localização dos componentes orgânicos e inorgânicos em estruturas complexas de pinturas são tarefas particularmente importantes, de forma a estudar e compreender as técnicas utilizadas pelos artistas, bem como planear formas de restauro (Albertini et al., 2011; Dolci et al., 2008). Muitas práticas têm sido desenvolvidas e aplicadas para a identificação de aglutinantes de origem animal em materiais históricos. Técnicas de identificação de proteínas através da quantificação de aminoácidos por GC-MS e técnicas proteómicas têm sido largamente aplicadas. Alternativamente, estudos têm sido desenvolvidos na avaliação da origem da fonte biológica da proteína, baseando-se na análise do DNA mitocondrial, onde a amplificação de sequências de DNA de animais extintos, mostrou o poder deste tipo de análise em materiais antigos. A análise do DNA mitocondrial representa um alvo ideal para a genotipagem, pois apresenta um elevado número de cópias por célula,

sendo útil na análise de espécimes antigos, ou amostras com baixa quantidade de material de partida (Albertini et al., 2011; Sciutto et al., 2012).

Os métodos imunológicos têm-se mostrado uma ferramenta útil e poderosa para a identificação de proteínas e determinação de outros compostos orgânicos em microamostras de obras de arte. Métodos como o teste imunoenzimático ELISA e a microscopia de imunofluorescência (IFM) têm sido aplicados na área do património cultural para uma deteção sensível e seletiva de proteínas (Cartechini et al., 2010; Heginbotham et al., 2006; Sciutto et al., 2011; Sciutto et al., 2012). A IFM combina a imuno-deteção de moléculas marcadas com sondas fluorescentes com a caracterização da sua distribuição espacial, importante no estudo estratigráfico das pinturas. Contudo a IFM apresenta a desvantagem da preparação da amostra ser um processo demorado (Cartechini et al., 2010). A técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) aplicada a bens patrimoniais mostra ser uma técnica vantajosa dada a maior facilidade de execução e análise das amostras. Estas duas técnicas imunológicas baseiam-se na interação específica entre antigénio-anticorpo, originalmente desenvolvidas nos campos da medicina e da biotecnologia, permitindo a distinção entre diferentes proteínas e a deteção da fonte biológica (Dolci et al., 2008; Palmieri et al., 2011; Schultz & Petersen, 2011).

2.4. Anticorpos e a sua produção

O anticorpo é uma imunoglobulina (Ig) constituída por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias leves (L- *light)* e duas cadeias pesadas (H- *heavy*) ligadas por pontes dissulfeto, com cópias idênticas de aminoácidos. O anticorpo é ainda constituído por dois domínios, domínio ou região constante, com a mesma sequência de aminoácidos, e domínio ou região variável, onde a sequência de aminoácidos é diferente. No domínio variável existe ainda a presença de regiões hipervariáveis, responsáveis pela

diversidade de anticorpos, que simultaneamente permite o reconhecimento e proteção do sistema imunitário contra diversos antigénios (Burry, 2010; Mazurek et al., 2008; Schultz & Petersen, 2011).

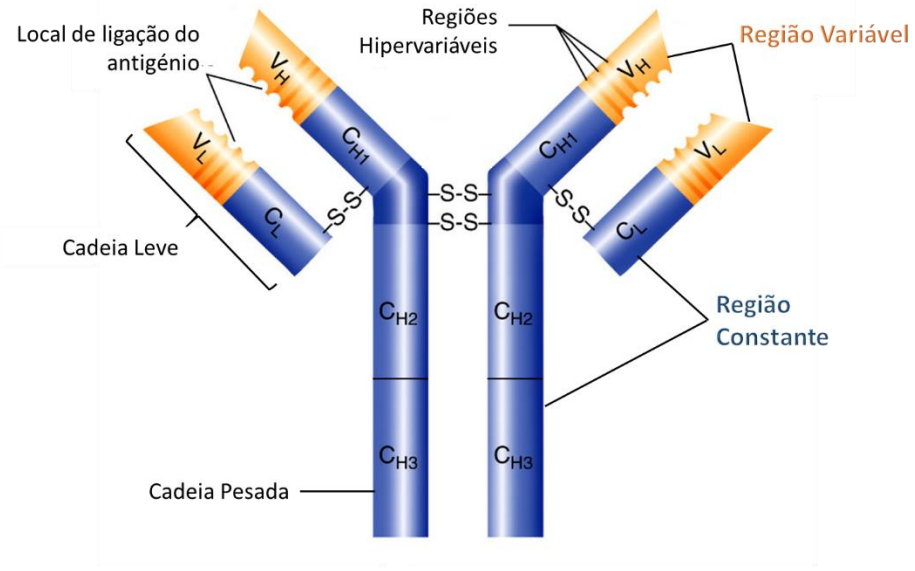

Figura 5- Estrutura geral de um anticorpo. C_L- região constante da cadeia leve, $C_{H1,2,3}$- regiões constantes da cadeia pesada, V_L- região variável da cadeia leve, V_H- região variável da cadeia pesada, S-S- ligações dissulfeto (adaptado S. University, 2010).

Nos ensaios de deteção de ligandos proteicos em pinturas podem utilizar-se dois tipos de anticorpos, os policlonais e os monoclonais. Os anticorpos policlonais são facilmente obtidos por imunização de animais, como coelho e rato, através de injeções subcutâneas com o antigénio específico, derivando do soro do animal imunizado. Estes são uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes epítopos do mesmo antigénio e que derivam de clones de células diferentes (Wilson & Walker, 2010).

Atualmente existem anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente, específicos para determinados epítopos, e produzidos artificialmente através de culturas de células animais. Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas que derivam de uma única linha celular, pelo que reconhecem apenas um epítopo do antigénio. Assim, enquanto os anticorpos policlonais são específicos para um

antigénio, os anticorpos monoclonais são específicos para um único epítopo (Wilson & Walker, 2010).

Os anticorpos encontrados na natureza são normalmente direcionados contra proteínas, contudo processos de imunização permitem a produção de anticorpos para uma variedade de moléculas. Assim podem ser produzidos especificamente contra um antigénio alvo através de modelos de imunização e cultura (Palmieri et al., 2011).

A produção de anticorpos comerciais altamente específicos para estudos na área do património cultural tem mostrado um enorme potencial oferecendo um largo campo para inovação, sendo uma abordagem relativamente recente nas áreas de conservação e restauro (Cartechini et al., 2010).

Existem atualmente anticorpos comerciais disponíveis que permitem a análise de aglutinantes proteicos em obras de arte, particularmente a caseína, albumina e ovalbumina, contudo relativamente a outros aglutinantes proteicos, nomeadamente colas animais, não existem anticorpos com um grau de especificidade adequado. Alguns estudos referem a utilização de anticorpos policlonais de colagénio (Palmieri et al., 2013; Palmieri et al., 2011), no entanto estas abordagens não permitem uma correta atribuição da origem animal da cola.

Este trabalho pretende contribuir para a identificação de aglutinantes e sua origem animal através da utilização de anticorpos específicos.

2.4.1. Tecnologia de Hibridomas

Os anticorpos desempenham um papel importante na deteção de um elevado número de moléculas, não apenas *in vivo* como *in vitro*. A Tecnologia de Hibridomas é uma tecnologia que permite a produção de anticorpos específicos direcionados a um antigénio de interesse. Esta técnica alterou, de forma revolucionária, a visão que se possuía até então sobre a utilização de anticorpos como ferramentas de prevenção,

diagnóstico, tratamento de doenças, produção de vacinas e caracterização antigénica (Pandey, 2010; Siddiqui, 2010).

A produção de anticorpos pela Tecnologia de Hibridomas pode resumir-se em quatro passos principais: imunização do animal, fusão das células do baço com células de mieloma, seleção dos hibridomas e *screening* da produção de anticorpos, e por último, clonagem e propagação dos hibridomas de interesse (Tyagi et al., 2011).

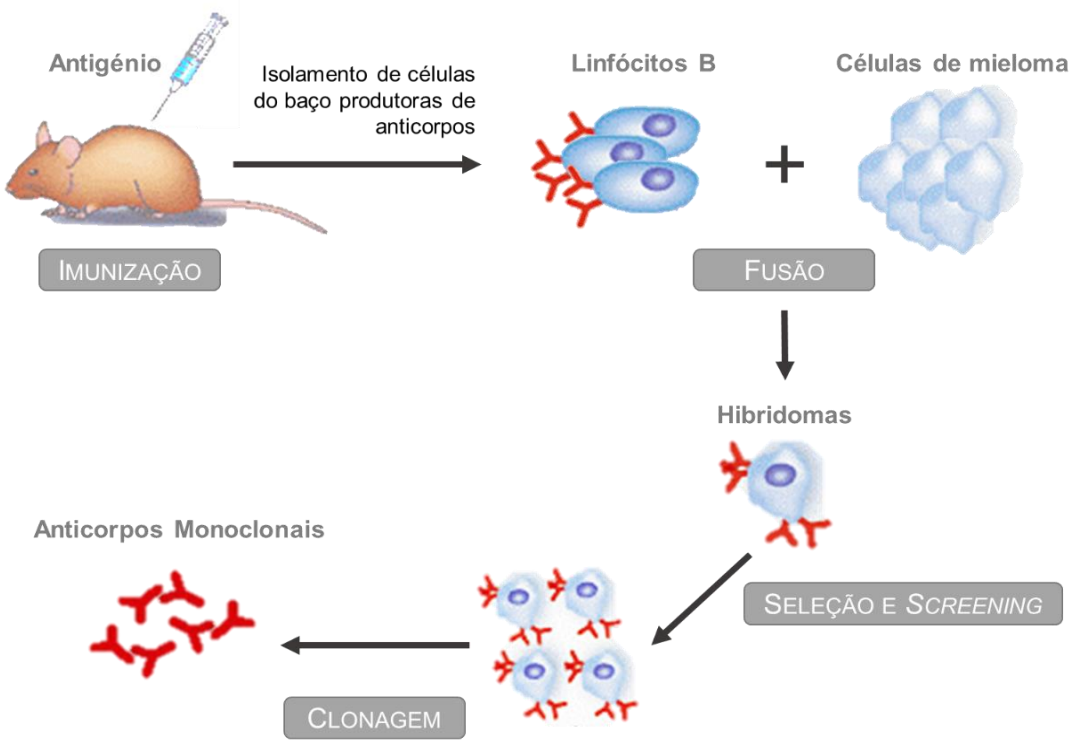

Figura 6- Esquema representativo da Tecnologia de Hibridomas para produção de anticorpos específicos contra antigénios de interesse (adaptado Pandey, 2010 e Tyagi et al., 2011).

O primeiro passo da técnica é a imunização do murganho com o antigénio de interesse. O animal é posteriormente sacrificado com o intuito de se isolar as células β do baço, produtoras de anticorpos. O passo seguinte envolve a fusão dos linfócitos com uma linha celular de mieloma, previamente mantida em cultura, de onde se irão formam os hibridomas. Estes são células com capacidade de se manter em cultura e de se desenvolver rapidamente (característica adquirida das células de mieloma), e produtoras de anticorpos específicos para o antigénio de interesse (característica

adquirida dos linfócitos). Os hibridomas são posteriormente selecionados num meio de cultura seletivo e de seguida, é realizado um *screening* dos clones positivos, pela técnica de ELISA, de forma a verificar os que produzem anticorpos com a especificidade requerida. Após selecionados os hibridomas, efetua-se a sua expansão e produção para obtenção dos anticorpos monoclonais (Burry, 2010; Pandey, 2010; Siddiqui, 2010; Tyagi et al., 2011).

Apesar do método ser relativamente dispendioso, o anticorpo produzido reconhece apenas um epítopo do antigénio e a produção de anticorpos monoclonais, ou Mabs, mostra-se bastante eficaz quanto à especificidade e afinidade para o antigénio em particular. A produção ilimitada e os problemas mínimos de reatividade que os anticorpos monoclonais possuem, quando comparados com os anticorpos policlonais, tornam a sua aplicação bastante vantajosa (Pandey, 2010; Tyagi et al., 2011).

3. METODOLOGIA

O trabalho experimental dividiu-se em três partes principais. A primeira diz respeito à caracterização e fracionamento proteico das colas animais selecionadas para este estudo. Na segunda parte do trabalho efetuou-se a caracterização de anticorpos específicos produzidos para a cola de pele de coelho, bem como o estudo da sua especificidade e reconhecimento. Na terceira parte do trabalho desenvolveram-se ensaios de reconhecimento de colas animais em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete, de forma a validar a metodologia desenvolvida neste trabalho para posterior aplicação em amostras reais.

3.1. Caracterização das colas

3.1.1. Determinação do conteúdo proteico

A quantificação das proteínas foi efetuada pelo método Bradford (Bradford, 1976) nas amostras das colas animais totais e nas frações purificadas pelas cromatografias de troca iónica (IEC) e de exclusão molecular (SEC). Este método baseia-se na ligação entre o corante Azul de Coomassie G-250 e as proteínas (Kruger, 2002). Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções padrão de BSA de concentrações 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg mL^{-1} (Anexo C, Figura **34**34). Em microplacas foram aplicados 100 µL da amostra (ou das soluções padrão, no caso da curva de calibração) e adicionados 100 µL da solução de Azul de Commassie G-250 0,6%. Após 3- 5 minutos foi lida a absorvância a 590 nm, utilizando um leitor de microplacas *Multiskan GO* da *Thermo Scientific*.

3.1.2. Determinação do conteúdo glucídico

O conteúdo glucídico nas amostras das colas animais totais e nas frações purificadas por IEC ou SEC foi determinado pelo método do fenol- ácido sulfúrico. O fenol na presença de ácido sulfúrico pode ser utilizado para quantificar de forma colorimétrica microamostras de açúcares e dos seus derivados, de oligossacáridos e

de polissacáridos (Dubois et al., 1956). Efetuou-se uma curva de calibração com soluções padrão de glucose de concentração 6, 12, 25, 50 e 100 µg mL^{-1} (Anexo C, Figura **35**35) Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL da solução em estudo (amostras ou soluções padrão de glucose, no caso da curva de calibração) com 100 µL da solução de fenol a 5% e 500 µL de ácido sulfúrico 95- 97%. No branco do ensaio substituiu-se a solução de açúcar por tampão fosfato ou água destilada, consoante a quantificação de polissacáridos nas frações purificadas por IEC/ SEC ou nas amostras/padrões de glucose, respetivamente. Após 10 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à agitação dos tubos de ensaio no vórtex à velocidade máxima. Aguardou-se 30 minutos à temperatura ambiente e por fim a absorvância foi lida a 490 nm, com o auxílio de um espetrofotómetro *U-3010* da *Hitachi*.

3.1.3. Determinação do conteúdo lipídico

A determinação do conteúdo em lípidos foi efetuada pelo método da Sulfofosfovanilina (Cheng et al., 2011; Postma & Stroes, 1968). Para a construção da curva de calibração utilizou-se o colesterol como padrão, com massas entre 0,0075 e 0,12 mg (Anexo C, Figura **36**36). Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL de solução em estudo (amostras ou padrão de colesterol, no caso da curva de calibração) com 900 µL de uma solução clorofórmio/metanol (proporção de 2:1) de forma a proceder-se à extração dos lípidos. No branco do ensaio substituiu-se a solução em estudo por tampão fosfato ou água destilada, consoante a quantificação de polissacáridos nas frações purificadas por IEC/ SEC ou nas amostras/padrões de glucose, respetivamente. Os tubos foram de seguida colocados num banho a 90°C durante 10 minutos de forma a proceder-se à evaporação da solução, obtendo-se um precipitado lipídico. Posteriormente foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, tendo as amostras sido deixadas a arrefecer no gelo durante 2 minutos. Por fim, adicionou-se 0,5 mL da solução de vanilina/ ácido fosfórico 17% levando à

formação de um cromóforo de cor rosa, cuja absorvância foi quantificada a 540 nm, com o auxílio de um espetrofotómetro *U-3010* da *Hitachi*.

3.1.4. Separação eletroforética das colas

A análise das quatro colas animais foi efetuada em condições não desnaturantes e desnaturantes.

3.1.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE- Nativa) foi preparado um gel cuja constituição se encontra descrita na Tabela 1, tendo em conta que a adição do persulfato de amónio à mistura é feita imediatamente antes da aplicação do gel entre as placas. Como marcadores moleculares foram utilizados a albumina do soro bovino (BSA) e um marcador comercial da Bio-Rad com pesos moleculares entre 10- 250 kDa. Após a polimerização do gel, preparou-se a eletroforese, utilizando o equipamento Mini-PROTEAN da Bio-Rad. O gel foi colocado no suporte e adicionado o tampão de eletroforese (Anexo B), e as amostras preparadas colocando num *eppendorf* 10 µL da amostra/ padrão com 10 µL de tampão de aplicação para PAGE- Nativa (Anexo B). Após a aplicação das amostras/ padrões no gel (20 µL por poço), a corrida eletroforética foi iniciada com uma diferença de potencial de 100 V até que o azul de bromofenol percorra todo o gel.

Na PAGE- Nativa o gel foi corado com uma solução corante de azul de coomassie R- 250 (Anexo B) e descorado com uma solução de diferenciação (Anexo B). Por fim, o registo fotográfico foi realizado e as bandas foram reveladas numa câmara de UV (Bio- Rad) utilizando o *software Quantity One*.

Tabela 1- Composição dos géis de concentração e resolução para PAGE- Nativa.

Composição dos géis para PAGE- Nativa	Gel de Concentração (2,5%)	Gel de Resolução (4%)
Acrilamida: Bisacrilamida (8: 0,8) (mL)	1,562	5
Tampão do gel de concentração (mL)	-	1,250
Tampão do gel de resolução (mL)	1,250	-
TEMED (µL)	5	7
H_2O (mL)	1,933	3,243
Persulfato de amónio (mL)	0,250	0,500

3.1.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi preparado um gel cuja constituição se encontra descrita na Tabela 2. Como marcadores moleculares foram utilizados a BSA, a ovalbumina e um padrão comercial *NZY Colour Protein Marker II* (Nzytech) com pesos moleculares entre 11-245 kDa. O procedimento para este tipo de eletroforese é semelhante ao utilizado na PAGE- Nativa, tendo sido substituídos os tampões de eletroforese e de aplicação das amostras para tampões para SDS- PAGE (Anexo B).

Os géis de poliacrilamida foram corados com a solução corante *BlueSafe* (Nzytech), e o registo fotográfico realizado, analisando ainda os géis numa câmara de UV (Bio-Rad) utilizando o *software Quantity One.*

Tabela 2- Composição dos géis de concentração e resolução para SDS- PAGE.

Composição dos géis para SDS- PAGE	Gel de Concentração (2,5%)	Gel de Resolução (4%)
Acrilamida: Bisacrilamida (8: 0,8) (mL)	1,562	5
Tampão do gel de concentração (mL)	-	1,250
Tampão do gel de resolução (mL)	1,250	-
TEMED (µL)	5	7
SDS 10 % (µL)	50	100
H_2O (mL)	1,883	3,143
Persulfato de amónio (mL)	0,250	0,500

3.1.5. Estudo da composição das colas por técnicas espetroscópicas e cromatográficas

3.1.5.1. Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização global das colas animais em estudo foi efetuada por espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) num espetrómetro *BRUKER Alpha*, utilizando a técnica de medição de refletância total atenuada (Corso et al., 2012). Todos os espetros foram recolhidos na região espetral de 4500 cm^{-1} a 375 cm^{-1} e foram determinados pela média de três medições independentes de 100 scans acumulados com uma resolução espetral de 4 cm^{-1}. Os resultados obtidos foram corrigidos e normalizados pelo *software OPUS 6.5*. (Na et al., 2010; Sjahfirdi et al., 2012).

3.1.5.2. Espetroscopia µ-Raman

Para a caracterização global das colas em estudo utilizou-se espetroscopia µ-Raman. As determinações foram efetuadas num espetrómetro Raman *HORIBA*

XploRA equipado com um separador de feixe de *quartzo* (quartz beam splitter), um detetor CCD (Charge Coupled Device) e um laser de excitação de 638 nm. O espetro de cada cola animal foi recolhido na região espetral de 300 cm^{-1} a 2300 cm^{-1}, numa sala escura à temperatura ambiente, utilizando um laser de 100 mW, com a objetiva de 50x, através da medição de 5 scans acumulados com uma resolução espetral de 5 cm^{-1} e com um tempo de exposição de 5 segundos. Os resultados obtidos foram corrigidos utilizando o *software NGS LabSpec 5 (Copyright 2008)*.

3.1.5.3. Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)

As amostras de colas animais foram separadas por HPLC usando uma coluna de cromatografia de exclusão molecular *Shodex SB-803 HQ* (8 x 300 mm, id 6 µm), com um intervalo de fracionamento entre 1- 100 kDa. O sistema de HPLC utilizado estava equipado com uma bomba *Hitachi Elite LaChrom Pump L-2100* com um injetor de *loop,* acoplado a um detetor ultravioleta de comprimento de onda variável (Hitachi L-2400) usado a 280 nm, e um detetor RI (Hitachi L-2490). Foram aplicados 50 µL da amostra diluída da cola em estudo, previamente filtradas em filtros Millipore HA 0,45 µm, na coluna de exclusão molecular, utilizando uma solução aquosa de 0,05% de NaCl como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL min^{-1}. Foram utilizados padrões de polietilenoglicol (PEG) 1,5 kDa, 3 kDa, 6 kDa e 20 kDa, da *Sigma Chemical Co., MO, USA* e as proteínas urease (480 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e tripsina (20,1 kDa) (Anexo D, Figuras 38 e 40) (Arteiro et al., 2012; Salvador et al., 2012).

3.2. Purificação das proteínas das colas

A separação e purificação do conteúdo proteico das colas animais foi efetuada por cromatografia de troca iónica (IEC) e por cromatografia de exclusão molecular (SEC).

3.2.1. Separação do conteúdo por cromatografia de troca iónica

Para a separação das proteínas por IEC foi utilizada uma coluna de 10 mL, usando como fase estacionária uma resina *DEAE Sepharose Fast Flow* (*GE Healthcare*), um permutador fraco de aniões, e como fase móvel tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6. Na coluna foi aplicado 1 mL de cola animal, e a eluição da amostra na fase inicial de lavagem da coluna foi efetuada a um caudal de 0,5 mL min^{-1}, bem como todo o ensaio. Foram recolhidas no total 68 frações com um volume de 2 mL, onde a absorvância das frações recolhidas foi medida a 280 nm, de forma a acompanhar a evolução do cromatograma e verificar a eluição das proteínas que não se ligam à coluna, com o auxílio de um espetrofotómetro *U-3010* da *Hitachi*. De forma a eluir as proteínas que ficam retidas na resina, foi aplicado um gradiente de cloreto de potássio (KCl) entre 0 e 1 M (25 mL tampão fosfato de potássio: 25 mL tampão fosfato de potássio com KCl 1 M). Para finalizar a eluição das proteínas aplicou-se um volume de KCl 1 M, terminando com KCl 2 M para confirmar a total eluição.

3.2.2. Separação do conteúdo por cromatografia de exclusão molecular

Na separação das proteínas pela SEC utilizou-se como fase estacionária uma resina *Sephacryl S- 100 (GE Healthcare)* com um intervalo de fracionamento entre 1 e 100 kDa, e como fase móvel um tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6. De seguida, procedeu-se à preparação do sistema cromatográfico, constituído por uma coluna de vidro, com um volume de 62,8 mL, à qual foi adaptada uma bomba peristáltica de fluxo variável. Após o empacotamento da coluna, foi aplicado nesta 2 mL de cola animal, e a eluição da amostra foi efetuada a um fluxo de 0,5 mL min^{-1}. Foram recolhidas no total 102 frações com um volume de 1,5 mL, onde a absorvância foi acompanhada a 280 nm, com o auxílio de um espetrofotómetro *U-3010* da *Hitachi*.

Para determinar o peso molecular das proteínas das frações recolhidas, foi construída uma curva de calibração (Anexo E, Figura 42) utilizando como padrões a BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), tripsina (20,1 kDa) e citocromo c (12,3 kDa), e como volume de exclusão o padrão azul dextrano (2000 kDa).

3.3. Análise dos anticorpos produzidos

3.3.1. Deteção e quantificação por ELISA

A confirmação do reconhecimento da cola animal pelos anticorpos produzidos foi efetuada por ELISA. O antigénio foi aplicado nas microplacas de 96 poços (50 µL/ poço) numa concentração de 300 mg mL^{-1}, diluído num tampão PBS 1x (pH 7,2). Após a lavagem dos poços com o tampão PBS 1x (150 µL/ poço), foi utilizada uma solução de BSA 1% como solução de bloqueio (100 µL/ poço) aguardando durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram aplicados os anticorpos produzidos (50 µL/ poço, direto ou diluído numa solução de BSA 0,1% em PBS 1x) e sucedeu novo período de incubação a 37°C, 1 hora. Seguiu-se novamente passos de lavagem com tampão PBS- Tween 20 0,05% (150 µL/ poço), e um segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, específico para o primeiro, foi adicionado (50 µL/ poço) com as respetivas diluições em BSA 0,1% em PBS- Tween 20 0,05%: IgG (*Rabbit anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate,* 1:1000) ou IgM (*Rabbit anti-mouse IgM alkaline phosphatase conjugate,* 1:5000). Após novo período de incubação a 37°C,1 hora, foram aplicados vários passos de lavagem (150 µL/ poço) com o tampão PBS- Tween 20 0,05%, H_2O destilada e tampão glicina 0,1 M. Por último aplicou-se substrato do enzima P-nitrofenilfosfato (p-NPP) (50 µL/ poço), da *Sigma Chemical Co., MO, USA,* e aguardou-se a reação a 37°C, durante 30 minutos, acompanhando a absorvância a 405 nm, utilizando um leitor de microplacas *Multiskan GO* da *Thermo Scientific*. (Liu et al., 2010; Zhou et al., 2012)

Durante o ensaio efetuou-se os seguintes controlos para validar o ensaio: sem antigénio, sem 1º anticorpo, sem 2º anticorpo e sem substrato.

Os resultados foram expressos em unidades de anticorpo por mL, sendo uma unidade de anticorpo definida como a quantidade de anticorpo necessária para produzir o aumento de uma unidade de absorvância a 405 nm após 30 min de reação do anticorpo conjugado *anti-mouse* IgG ou IgM com o substrato (Martins et al., 2005; Martins et al., 2011).

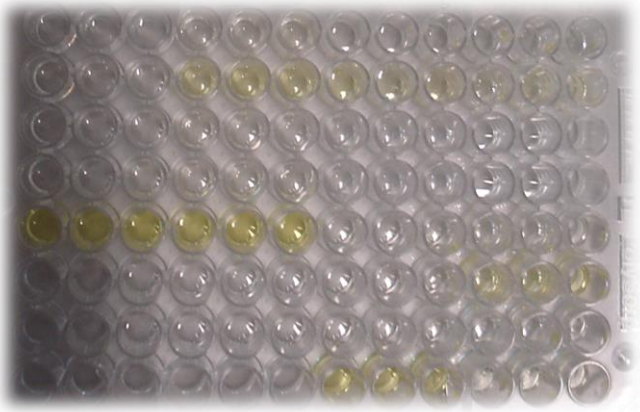

Figura 7- Placa de 96 poços para realizar ensaios ELISA. Os poços com coloração amarela indicam os poços onde ocorreu reconhecimento do antigénio pelo anticorpo.

3.3.2. Determinação da especificidade dos anticorpos por *Western Blotting*

A especificidade dos anticorpos foi determinada por *Western Blotting*. Em primeiro lugar, foi efetuada uma eletroforese das amostras, em condições nativas, utilizando dois géis de poliacrilamida (4%). Cada gel foi dividido em duas seções, uma para posterior coloração com solução corante de azul de coomassie R-250, e outra utilizada para realizar a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando *VWR® Mini PAGE Eletroblotting System*, com uma intensidade de corrente 2 mA/ cm^2 de gel (A_{gel}= 49,8 cm^2, 2 mA x A_{gel}= 99,6 mA, aproximadamente 100 mA). Após 3 horas de transferência, uma ELISA foi realizada para avaliar o reconhecimento

das bandas das amostras proteicas transferidas pelos anticorpos produzidos. Foi aplicado um segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, neste caso IgG diluído 1:1000 num tampão TTBS (Anexo B) e 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (BCIP) como substrato diluído em Tampão Tris (AnexoB).

3.4. Reconhecimento das colas animais em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete

Foram construídas provetes de camada de preparação para pintura de cavalete utilizando as diferentes colas animais: cola de pele de coelho, cola de coelho e cola de pele de carneiro. Estas provetes foram produzidas no Departamento de Conservação e Restauro de Pintura do Instituto de Conservação dos Museus, Laboratório José de Figueiredo. Recolheram-se pequenos fragmentos de amostra com cerca de 1 mg da superfície da provete para tubos *eppendorf* (1,5 mL), com a ajuda de um bisturi e adicionaram-se 500 µL de tampão PBS 1x (pH 7.2). As amostras foram colocadas num banho de ultrassons durante três horas e incubadas a 25ºC durante 24 horas, em agitação orbital a 250 rpm (Palmieri et al., 2013; Palmieri et al., 2011). Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 3000 *g* durante 15 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado como antigénio nos ensaios de ELISA.

Figura 8- Provetes utilizadas nos ensaios para obtenção das amostras proteicas. A- Provete de cola de pele de coelho, B- Provete de cola de coelho, C- Provete de cola de carneiro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das colas

4.1.1. Determinação do conteúdo orgânico das colas animais

Selecionaram-se quatro aglutinantes proteicos para estudo, comumente utilizados nas pinturas de cavalete para estudo: a cola animal de pele de coelho, cola animal de coelho, cola animal de pele de carneiro e cola animal de pescada.

Nas colas animais foi determinado o conteúdo em proteínas, polissacáridos e lípidos. Na figura 9 estão representados as percentagens do conteúdo orgânico total de cada aglutinante.

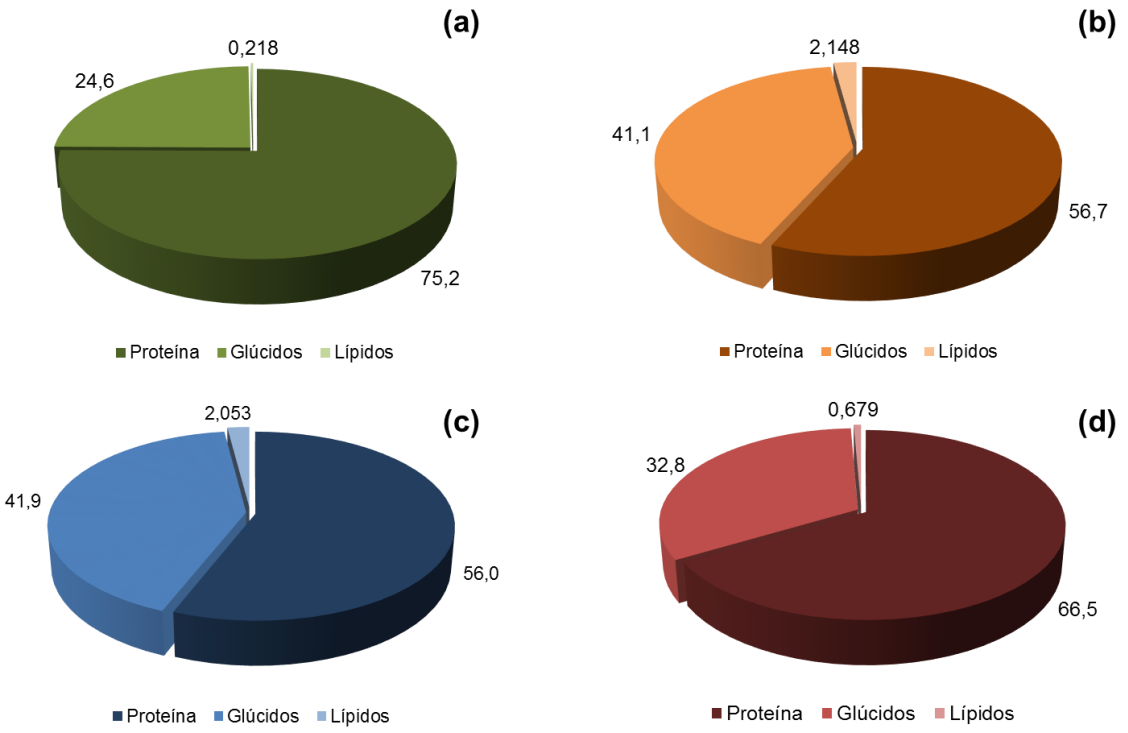

Figura 9- Composição orgânica, em percentagem (%), dos aglutinantes em estudo. (a)- Cola de Pele de Coelho, (b)- Cola de Coelho, (c)- Cola de Pele de Carneiro, (d)- Cola de Pescada.

Todas as colas são constituídas por mais de 50% em proteínas, onde o conteúdo proteico varia entre 56% na cola de pele de carneiro, até cerca de 75% na cola de pele de coelho. A concentração de glúcidos é inferior, oscilando entre 25% na cola de pele

de coelho e 42% na cola de carneiro. O conteúdo lipídico é mais baixo, inferir a 2,5% em todas os aglutinantes.

De facto os materiais orgânicos utilizados como ligandos em pinturas de cavalete são, maioritariamente, de origem proteica.

4.1.2. Análise de proteínas presentes nas colas animais por métodos eletroforéticos

Foram efetuadas eletroforeses em condições não desnaturantes (PAGE- Nativa) para as quatro colas em estudo, revelando a presença de proteínas com massas moleculares superiores a 250 kDa (Figura 10).

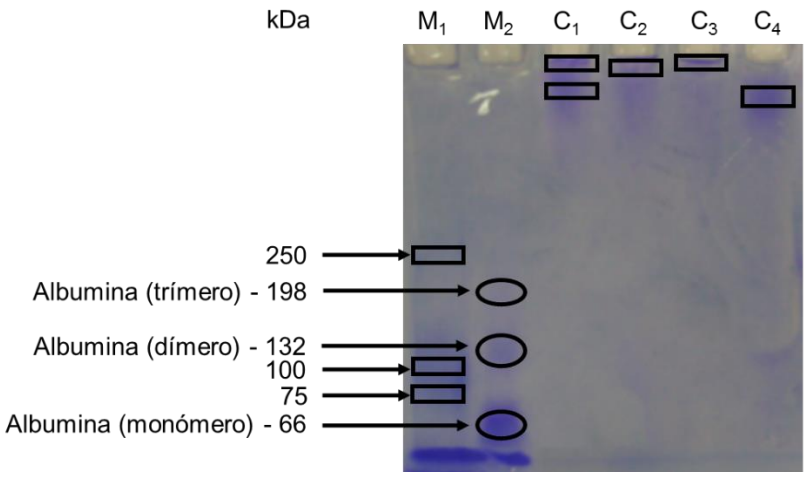

Figura 10- Eletroforetograma PAGE- Nativa das colas animais. M_1- Padrão comercial; M_2- BSA; C_1- Cola de Pele de Coelho; C_2- Cola de Coelho; C_3- Cola de Pele de Carneiro; C_4- Cola de Pescada.

As diferentes mobilidades eletroforéticas observadas demonstram que as quatro colas animais têm diferente constituição proteica. A Figura 11 apresenta um eletroforetograma para os mesmos aglutinantes, efetuado em condições desnaturantes.

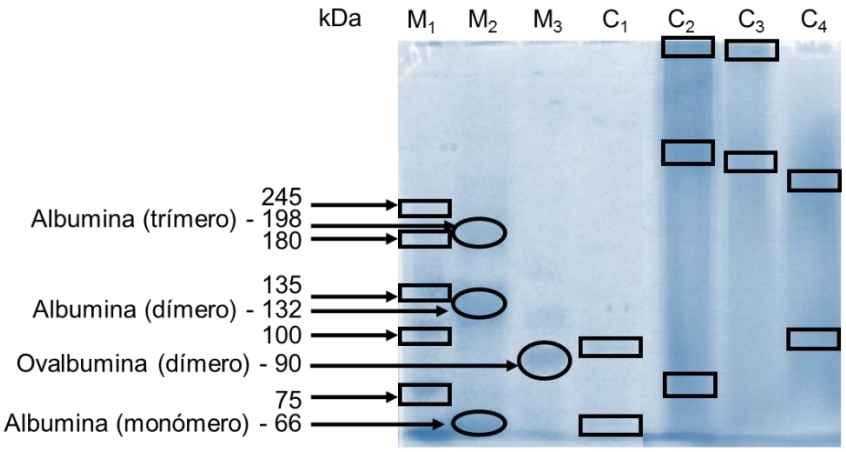

Figura 11- Eletroforetograma SDS- PAGE das colas animais. M_1- Padrão comercial; M_2- BSA; M_3- Ovalbumina; C_1- Cola de Pele de Coelho; C_2- Cola de Coelho; C_3- Cola de Pele de Carneiro; C_4- Cola de Pescada

O eletroforetograma SDS-PAGE permitiu a visualização de bandas proteicas distintas para cada cola animal em estudo. A cola de pele de coelho (C_1) apresentou duas bandas distintas, uma com cerca de 66 kDa e uma segunda banda com MM entre 90 e 100 kDa. A cola de coelho (C_2), por sua vez, mostrou três bandas distintas, uma com MM entre 75 e 90 kDa e duas bandas com MM superiores a 245 kDa. Na cola de pele de carneiro (C_3) verifica-se também a presença de duas bandas com MM superiores a 245 kDa, tal como na cola de coelho, mas com mobilidade eletroforética diferente, sendo esta ligeiramente superior na cola de pele de carneiro. Por último, a cola de pescada (C_4) revelou a presença de duas bandas proteicas, uma com cerca de 100 kDa e uma segunda banda com MM superior a 245 kDa.

Maioritariamente as colas são constituídas por colagénio, pois são produzidas a partir de pele, osso, músculos, entre outros (Lluveras et al., 2010). Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a presença de proteínas distintas, consoante a origem da cola animal em estudo, o que sugere que para ensaios imunológicos é fundamental a produção de anticorpos específicos dirigidos para cada um destes aglutinantes e/ou frações proteicas maioritárias, de forma a conseguir diferenciar a origem animal do ligando proteico utilizado nas pinturas.

4.1.3. Análise de proteínas presentes nas colas animais por métodos cromatográficos

A separação das colas animais foi efetuada por HPLC, utilizando uma coluna de exclusão molecular e detetores de UV e RI (SEC-UV-RI-HPLC). A Figura 12 mostra os cromatogramas obtidos para cada uma das colas.

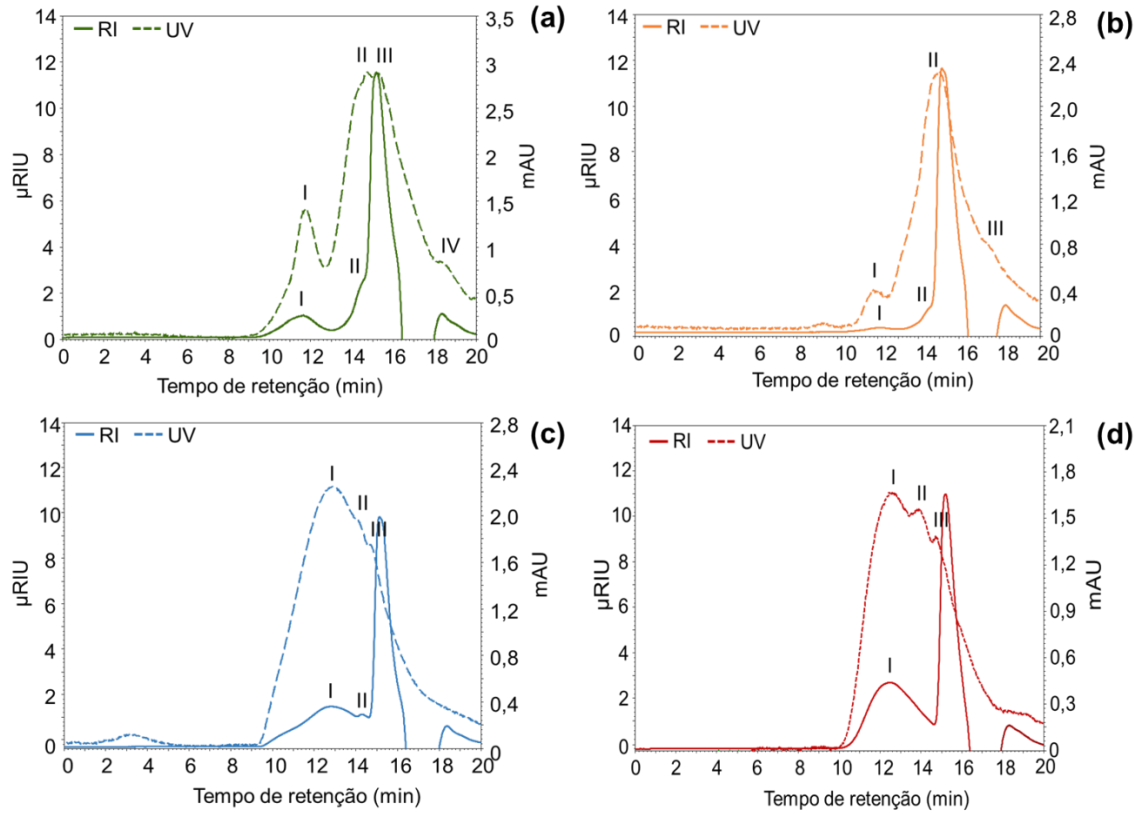

Figura 12- Análise HPLC dos aglutinantes utilizando detetores de RI e UV acoplados com SEC (MM- massa molecular, kDa). A- cola animal de pele de coelho, B- cola animal de coelho, C- cola animal de pele de carneiro, D- cola animal de pescada.

De uma forma geral, foi possível detetar entre três a quatro compostos proteicos, alguns deles associados a compostos glucídicos (Tabela 3).

Tabela 3- Massas moleculares médias dos compostos proteicos e glucídicos presentes nos aglutinantes, determinados por cromatografia de exclusão molecular num sistema HPLC.

Aglutinantes	Picos UV Massa Molecular (kDa)				Picos RI Massa Molecular (kDa)	
	I	II	III	IV	I	II
Cola de Pele de Coelho	> 100	< 100 >66	47,6	< 20,1	< 100 > 20	1,7
Cola de Coelho	> 100	61,4	< 20,1	---	16,5	2,1
Cola de Pele de Carneiro	> 100	> 100	56,9	---	9,5	4,7
Cola de Pescada	> 100	> 100	62,3	---	12,4	---

Os valores das massas moleculares são resultado da média de três medições independentes.

Para a cola de pele de coelho foi possível separar quatro compostos proteicos com massas moleculares diferentes, um com MM superior a 100 kDa e outro com MM entre 66 kDa e 100 kDa, que parecem estar associadas a compostos glucídicos. Outros dois compostos proteicos foram detetados, um composto com MM de 51,8 kDa e um último inferior a 20,1 kDa.

Na cola de coelho, por sua vez, separaram-se três compostos proteicos, um com MM superior a 100 kDa e um segundo com MM de 61,4 kDa, que parecem estar associados a compostos glucídicos. Um último composto proteico foi separado, com MM inferior a 20,1 kDa.

A cola de pele de carneiro apresentou três compostos proteicos de MM diferentes, dois dos quais com MM superior a 100 kDa, onde o primeiro parece estar associado a um composto glucídico.

Por último, a cola de pescada mostrou três compostos proteicos com MM diferentes, dos quais dois apresentam MM superior a 100 kDa. O último composto apresenta MM de 62,3 kDa.

Os dados cromatográficos corroboram com os dados eletroforéticos, demonstrando o diferente conteúdo proteico destes ligandos, refletindo também uma diferente composição glucídica das amostras, o que confirma a presença de compostos polissacarídicos nestes aglutinantes.

4.1.4. Análise das colas animais por métodos não destrutivos

Para a caracterização e identificação de amostras reais é necessário encontrar técnicas que sejam não destrutivas e que permitam a análise diretamente nos objetos em estudo.

A caracterização total das quatro colas animais foi efetuada pelas técnicas de FTIR-ATR e Raman, duas técnicas não destrutivas.

As figuras 13- 16 mostram os espetros obtidos para os aglutinantes animais por FTIR e Raman. A atribuição das bandas dos espetros com os respetivos compostos foi efetuada de acordo com a leitura.

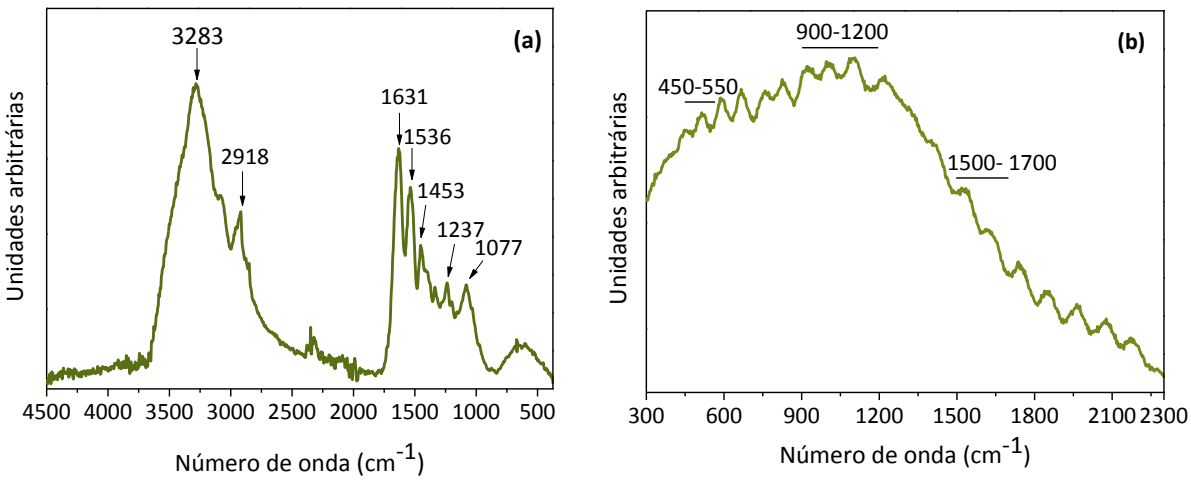

Figura 13- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pele de coelho.

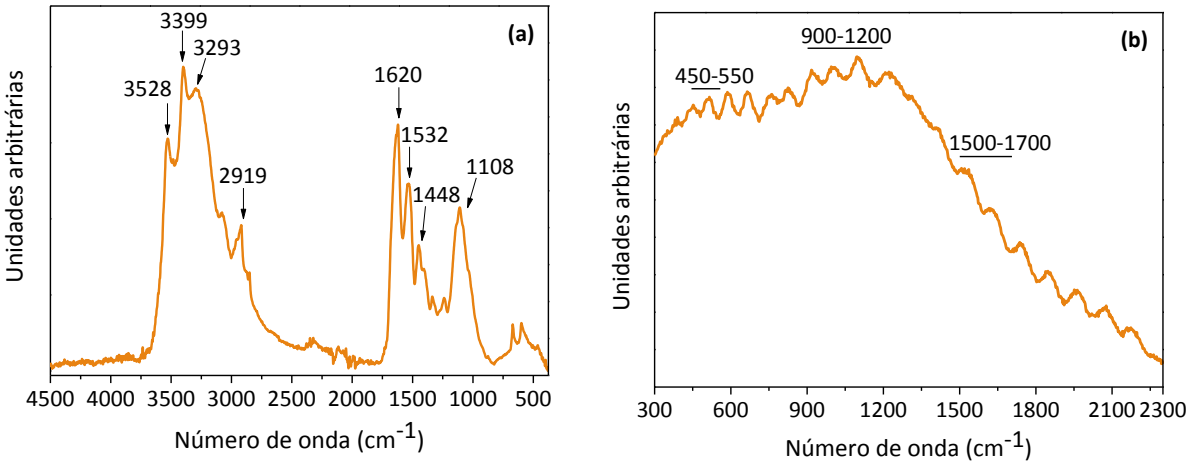

Figura 14- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de coelho.

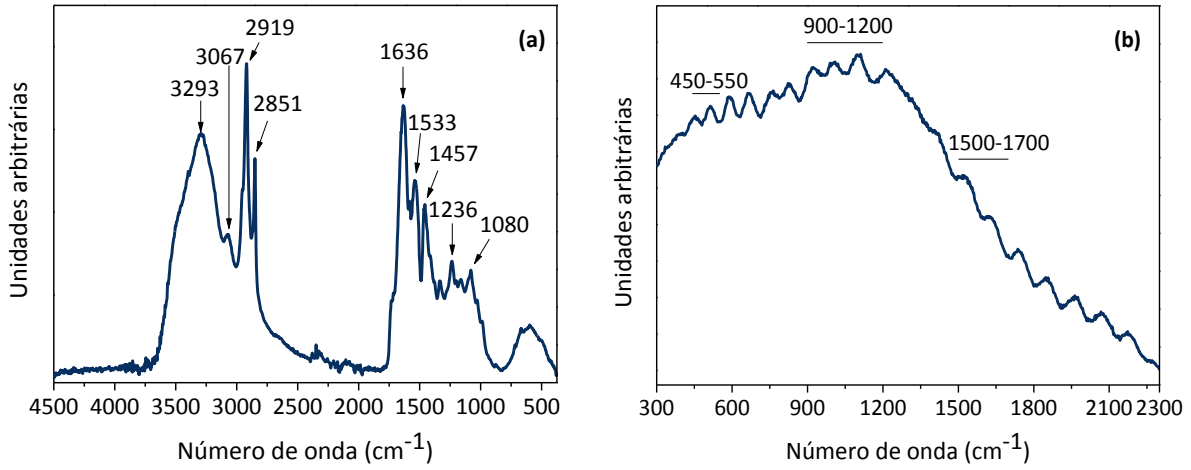

Figura 15- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pele de carneiro.

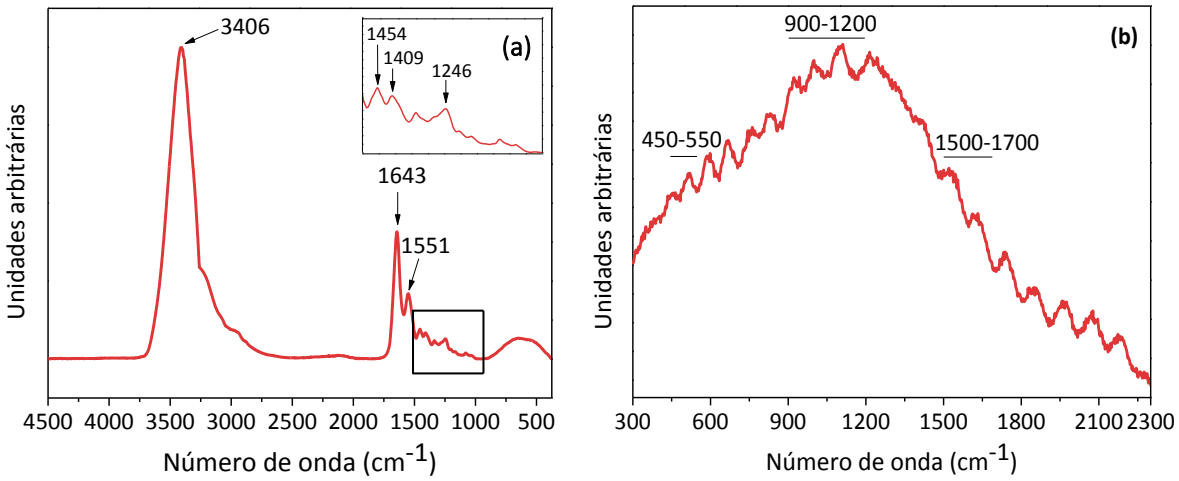

Figura 16- Espetro FTIR- ATR (a) e espetro Raman (b) da cola animal de pescada.

A observação dos espetros permitiu a identificação de bandas de IR intensas e amplas na região espetral entre 3000 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} que surgem das vibrações de elongação OH dos hidroxilos e da água (Akon & Min, 2008; Corso et al., 2012; Duygu et al., 2012; Na et al., 2010). Bandas moderadas de IR nas colas de pele de coelho, coelho e pele de carneiro de cerca de 2918/ 2919 cm^{-1} devem-se às vibrações de elongação CH_2 dos lípidos (Akon & Min, 2008; Corso et al., 2012; Dean et al., 2010; Duygu et al., 2012). As duas bandas intensas e moderadas de IR na zona entre 1550 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} correspondem às vibrações de elongação C=O, C–O e N–H, provenientes da presença das proteínas Amida I e Amida II (Akon & Min, 2008; Dean et al., 2010; Stuart, 2007; Synytsya et al., 2009). Bandas no espetro Raman na região entre 1500 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} são caraterísticas das mesmas vibrações de elongação dos grupos proteicos Amida I e Amida II (Synytsya et al., 2009; Vandenabeele et al., 2000). Bandas moderadas e pequenas de IR na zona dos 1450 cm^{-1} correspondem à elongação CH_2 e CH_3 do grupo metilo das proteínas (Corso et al., 2012; Dean et al., 2010). Bandas de IR moderadas e fracas, e bandas Raman na região dos 900 cm^{-1}a cerca de 1200 cm^{-1} são caraterísticas de carbohidratos, e correspondem às vibrações de acoplação CO e elongação CC, e às vibrações de deformação COH dos polissacáridos (Corso et al., 2012; Dean et al., 2010; Na et al., 2010; Stuart, 2007). Bandas Raman na região espetral de aproximadamente 899 cm^{-1} e na região entre 450 cm^{-1} e 500 cm^{-1} podem ser associadas à presença de polissacáridos β e α-glucanos. (Na et al., 2010; Synytsya et al., 2009)

É importante conhecer as assinaturas moleculares dos aglutinantes para subsequente deteção em amostras reais. A presença destas assinaturas nos espetros de Raman não possibilitou distinguir a origem da cola animal mas claramente indica a presença de aglutinantes proteicos. Os espetros de FTIR-ATR parecem permitir discriminar as colas de coelho das colas de carneiro e peixe, no entanto um estudo mais alargado utilizando diferentes lotes destas colas é necessário para confirmar

estes resultados. Por outro lado a aplicabilidade destas análises em amostras reais pode estar limitada devido a outras interferências com a matriz da pintura.

4.2. Fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais

As amostras das quatro colas foram fracionadas por cromatografia de troca iónica (IEC) e cromatografia de exclusão molecular (SEC). É importante obtermos frações das diferentes proteínas das colas para se poder detetar quais das frações proteicas são reconhecidas pelos anticorpos.

As figuras 17- 20 mostram os cromatogramas obtidos utilizando a IEC para purificar as colas animais em estudo. Apresentam também o teor em proteína e polissacárido nas frações purificadas. A quantificação de lípidos não foi efetuada pois a quantidade destes era apenas vestigial.

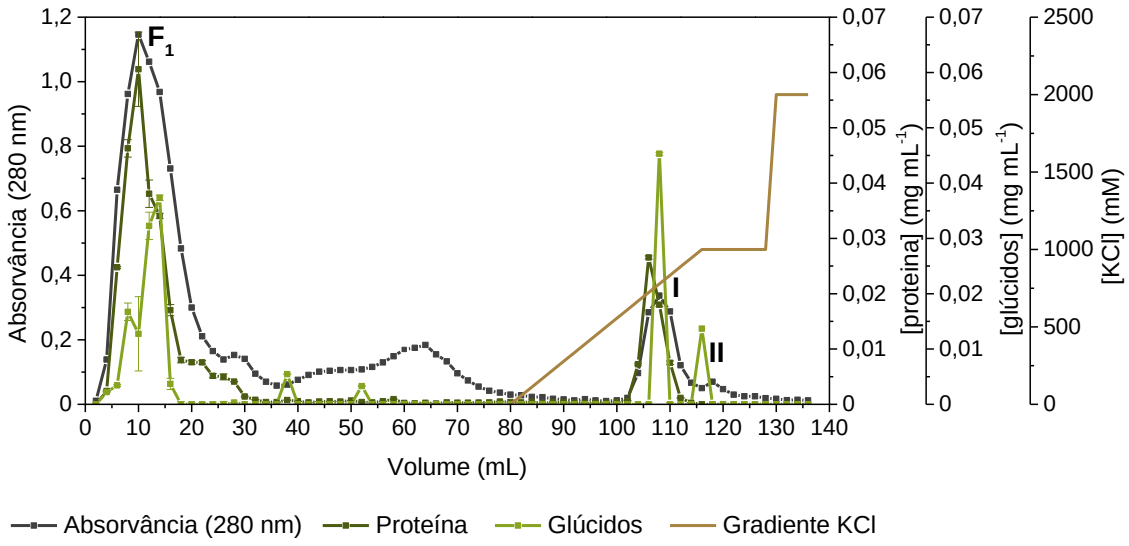

Figura 17- Fracionamento por IEC da cola animal de pele de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente.

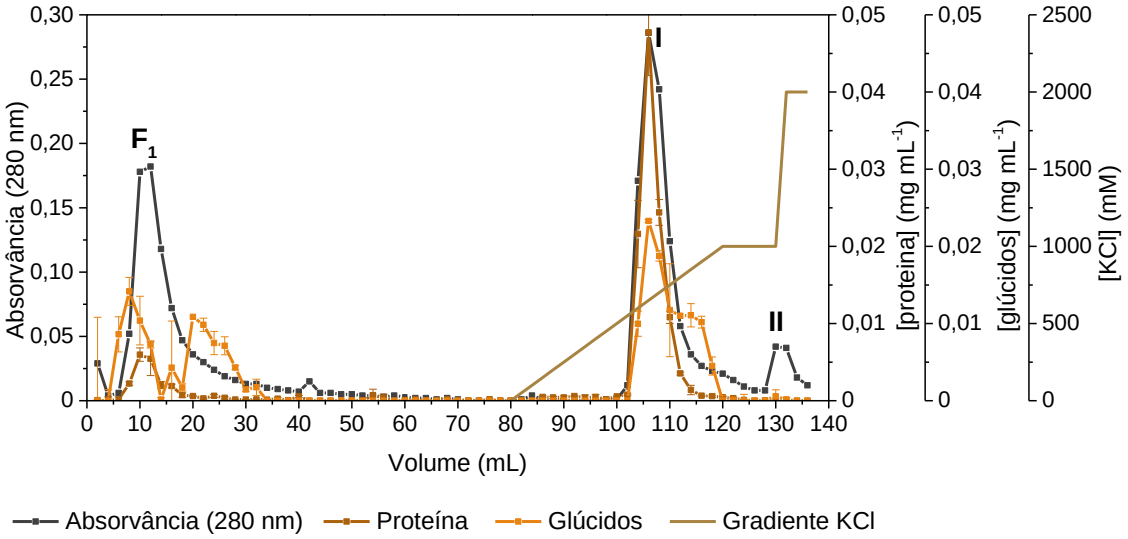

Figura 18- Fracionamento por IEC da cola animal de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente.

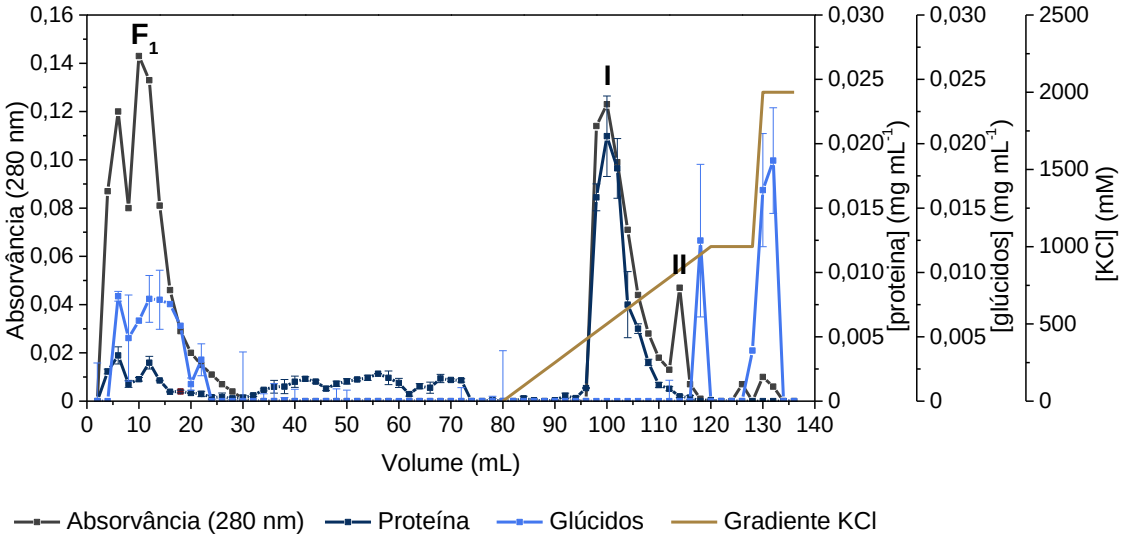

Figura 19- Fracionamento por IEC da cola animal de pele de carneiro e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I, II- frações proteicas recolhidas durante o gradiente.

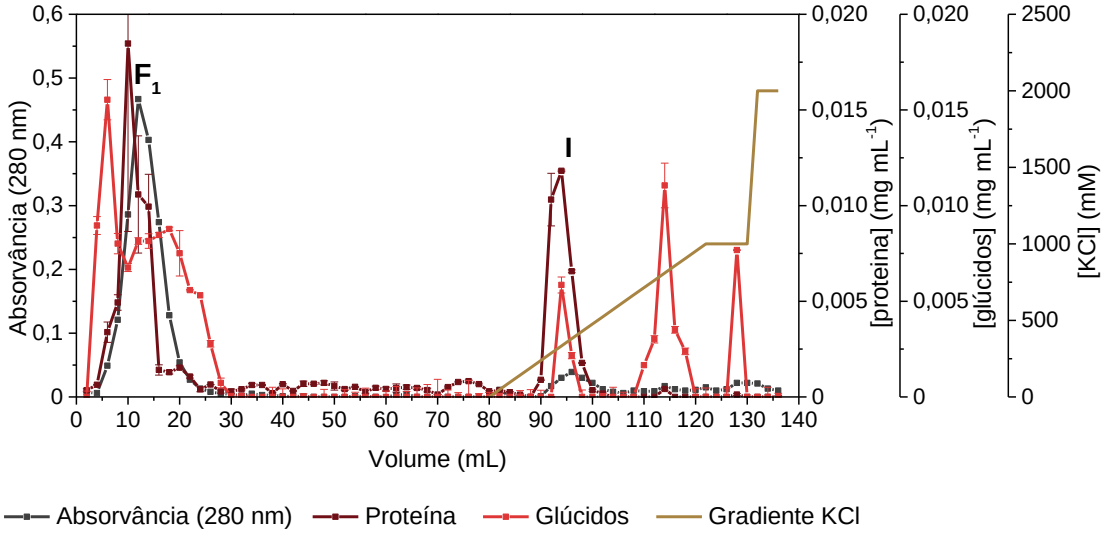

Figura 20- Fracionamento por IEC da cola animal pescada e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações purificadas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. F_1- fração proteica recolhida antes da aplicação do gradiente; I- fração proteica recolhida durante o gradiente.

Por cromatografia de troca iónica foi possível separar duas frações aniónicas nas colas de pele de coelho (Figura 17), cola de coelho (Figura 18) e cola de pele de carneiro (Figura 19), e uma única fração aniónica na cola de pescada (Figura 20).

Tabela 4- Percentagem proteica e polissacarídica recolhida após o fracionamento das colas na coluna de IEC.

Percentagem (%)	Cola de Pele de Coelho	Cola de Coelho	Cola de Pele de Carneiro	Cola de Pescada
Proteínas	95,6	75,6	56,6	45,5
Polissacáridos	81,5	92,6	94,5	98,0

Pela determinação do conteúdo em proteínas e polissacáridos pode verificar-se, de uma forma geral, que o fracionamento correspondeu a percentagens de recuperação elevadas, superior a 55% no conteúdo proteico e superior a 80% no conteúdo glucídico, com exceção da eluição da proteína na cola animal de pescada, onde

apenas foi possível recolher 45,5% do valor total de proteínas da cola em estado bruto (Tabela 4).

Nas figuras 21- 24 estão apresentados os cromatogramas obtidos para cada aglutinante por SEC.

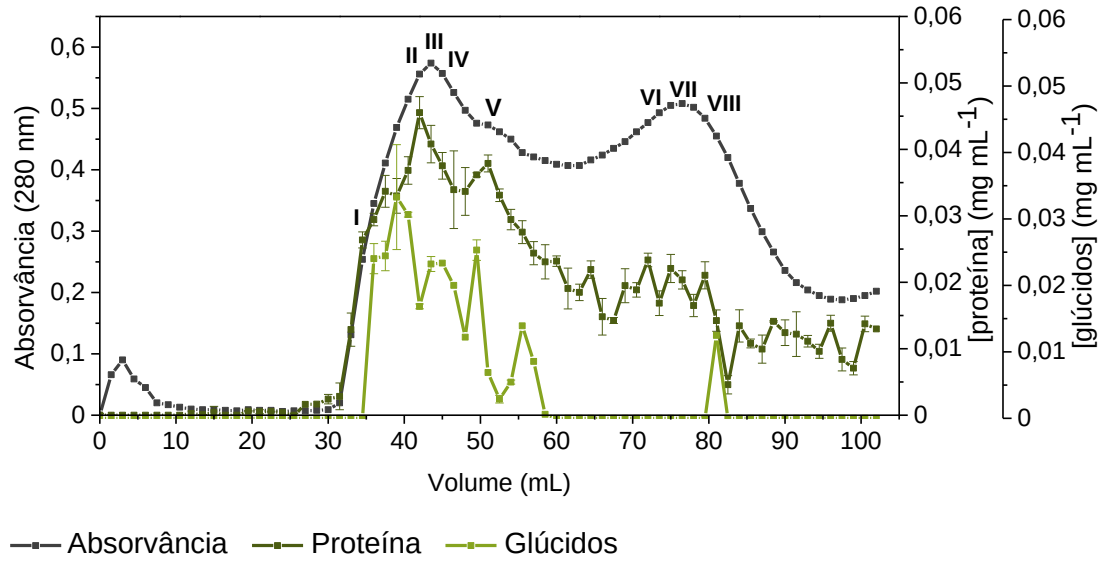

Figura 21- Fracionamento por SEC da cola animal de pele de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII- frações purificadas selecionadas.

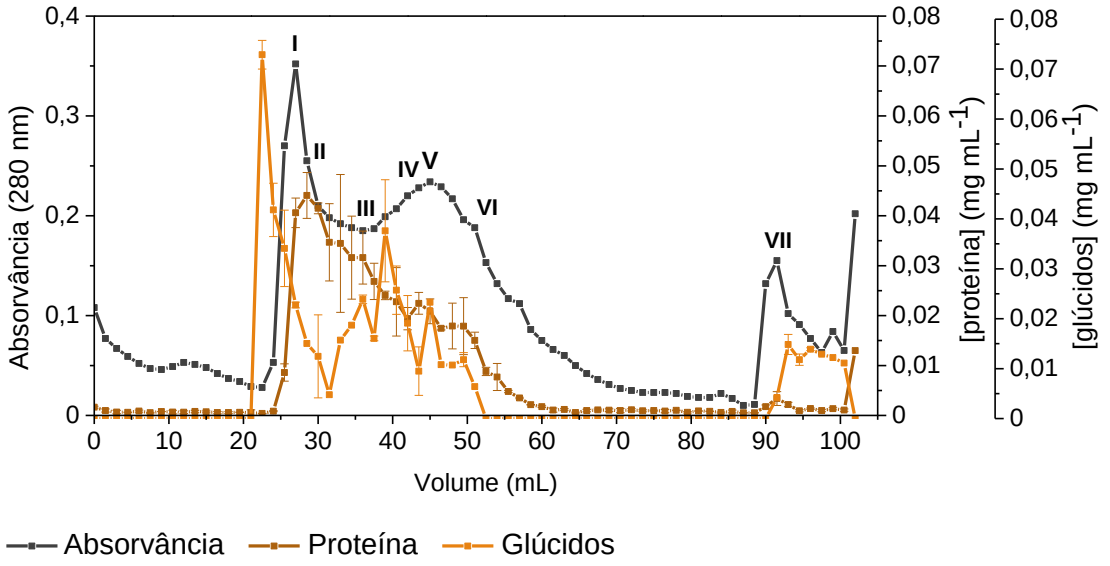

Figura 22- Fracionamento por SEC da cola animal de coelho e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas.

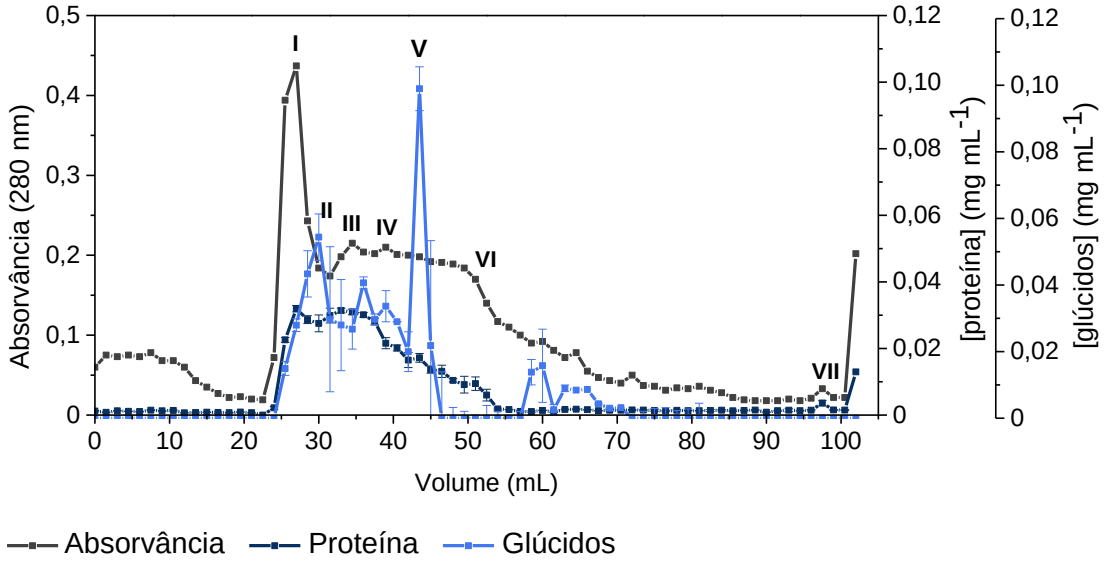

Figura 23- Fracionamento por SEC da cola animal de pele de carneiro e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas.

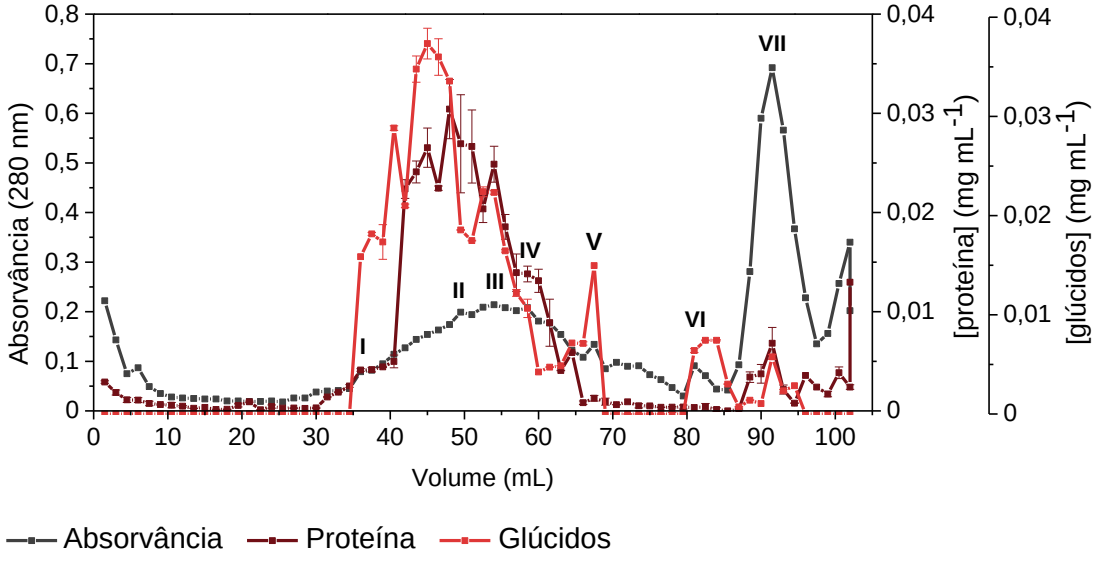

Figura 24- Fracionamento por SEC da cola animal de pescada e determinação do conteúdo proteico e glucídico nas frações recolhidas. Os valores apresentados são resultado da média ± desvio padrão de quatro réplicas. I, II, III, IV, V, VI, VII - frações purificadas selecionadas.

A tabela 5 apresenta a percentagem de recuperação em proteína e em glúcidos, após fracionamento das colas animais por SEC.

Tabela 5- Percentagens de recuperação de proteína e polissacárido após fracionamento das colas animais por SEC.

Percentagem (%)	Cola de Pele de Coelho	Cola de Coelho	Cola de Pele de Carneiro	Cola de Pescada
Proteína	77,6	98,2	47,4	31,7
Polissacáridos	98,4	77,7	95,0	85,3

Pela determinação das percentagens de recuperação de proteína e polissacárido (Tabela 5), o conteúdo em proteínas e polissacáridos pode verificar-se que o fracionamento mostrou percentagens de recuperação elevadas, de uma forma geral, superior a 75% no conteúdo polissacarídico e proteico, com exceção da eluição da proteína na cola animal de pele de carneiro e de pescada, onde apenas foi possível recolher 47,4% e 31,7%, respetivamente, do valor total de proteínas da cola em estado bruto.

Na tabela 6 estão apresentadas as massas moleculares das proteínas purificadas por SEC.

Tabela 6- Massas moleculares das frações proteicas purificadas presentes nos aglutinantes, obtidas por SEC.

Aglutinantes	Frações Massas Moleculares (kDa)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Cola de Pele de Coelho	> 66 < 100	47,4	38,8	31,8	14,3	< 12,3	< 12,3	< 12,3
Cola de Coelho	> 100	> 100	> 66 < 100	31,8	26	14,3	< 12,3	---
Cola de Pele de Carneiro	> 100	> 100	> 100	57,9	31,8	< 12,3	< 12,3	---
Cola de Pescada	> 100	17,4	< 12,3	< 12,3	< 12,3	< 12,3	< 12,3	---

Na cola de pele de coelho foi possível separar oito frações proteicas, três frações com MM inferior a 12,3 kDa, quatro com MM de 14,3 kDa, 31,8 kDa, 38,8 kDa e 47,4 kDa e uma com MM entre 66 kDa e 100 kDa.

Na cola de coelho a técnica de SEC permitiu a separação de sete frações proteicas, uma com MM inferior a 12,3 kDa, três frações com MM de 14,3 kDa, 26 kDa e 31,8 kDa, uma fração com MM superior a 66 kDa e duas frações onde não foi possível determinar a MM, sendo esta superior a 100 kDa.

Na cola de pele de carneiro separaram-se sete frações proteicas, duas frações com MM inferior a 12,3 kDa, duas frações com MM de 31,8 kDa e 57,9 kDa e as restantes com MM superior a 100 kDa.

Por último, na cola de pescada foi possível separar sete frações proteicas, cinco com MM inferior a 12,3 kDa, uma fração com MM 17,4 kDa e uma última fração superior a 100 kDa.

As frações obtidas foram usadas nos ensaios de reconhecimento e seletividade dos anticorpos (ponto 4.3.3.).

4.3. Análise dos anticorpos produzidos

4.3.1 Reconhecimento da cola de pele de coelho pelos anticorpos

A produção de anticorpos para o aglutinante de pele de coelho foi efetuada pela Tecnologia de Hibridomas e obtiveram-se dez anticorpos diferentes: 5.34, 3.18/2.2, 3.14, 4.26, 1.4, 3.24, 2.14, 3.18, 2.13, 2.17.

A tabela 7 mostra a classe dos anticorpos e o reconhecimento do aglutinante pelos vários anticorpos.

Tabela 7- Atividade do anticorpo na determinação do reconhecimento da cola animal de pele de coelho e respetiva classe.

Anticorpo	Classe	Atividade do anticorpo (U mL^{-1})
5.34	IgG	96,45 ± 2,62
3.18/2.2	IgG	1,45 ± 0,14
3.14	IgM	80,70 ± 7,57
4.26	IgG	0,85 ± 0,06
1.4	IgM	3,05 ± 0,24
3.24	IgG	3,00 ± 0,20
2.14	IgM	0,90 ± 0,07
3.18	IgM	0,80 ± 0,02
2.13	IgG	41,05 ± 2,52
2.17	IgG	23,14 ± 1,34

Os valores de atividade do anticorpo resultam da média ± desvio padrão de três réplicas.

Verificou-se que, de todos os anticorpos produzidos especificamente para o aglutinante de pele de coelho, os anticorpos 2.13, 2.17, 3.14 e 5.34 mostraram maior reconhecimento para o antigénio, tendo este sido superior nos 5.34, 3.14 e 2.13, com uma atividade de 96,45 ± 2,62 U mL^{-1}, 80,70 ± 7,57 U mL^{-1} e 41,05 ± 2,52 U mL^{-1}, respetivamente. Para o anticorpo 2.17 a atividade foi apenas de 23,14 ± 1,34 U mL^{-1}.

4.3.2. Especificidade dos anticorpos para a cola animal de pele de coelho

A especificidade dos anticorpos 2.13, 2.17, 3.14 e 5.34 para o aglutinante animal de pele de coelho foi determinada pelo método ELISA utilizando vários tipos aglutinantes (colas animais de coelho, pele de carneiro e pescada, gema, clara e leite) e antigénios comerciais (albumina e ovalbumina). A tabela 8 mostra os valores de reconhecimento, indicados pela atividade do anticorpo (U mL^{-1}) para cada antigénio em estudo.

Tabela 8- Atividade do anticorpo para determinação da especificidade dos anticorpos produzidos.

Antigénio	Atividade do anticorpo (U mL^{-1})			
	2.13	2.17	3.14	5.34
Cola de Pele de Coelho	48,45 ± 1,04	22,46 ± 3,93	90,28 ± 8,65	104,87 ± 11,02
Cola de Coelho	16,90 ± 1,24	16,98 ± 2,29	1,57 ± 0,25	124,12 ± 12,66
Cola de Pele de Carneiro	18,42 ± 1,08	21,28 ± 5,06	0,08 ± 0,00	99,80 ± 3,87
Cola de Pescada	2,66 ± 0,24	21,55 ± 2,76	1,90 ± 0,42	112,57 ± 9,48
Gema	0,67 ± 0,09	47,77 ± 5,98	1,27 ± 0,22	1,53 ± 0,07
Clara	0,28 ± 0,07	3,80 ± 0,86	1,07 ± 0,14	1,73 ± 0,03
Leite	0,26 ± 0,03	1,26 ± 0,23	1,20 ± 0,10	1,70 ± 014
Albumina	1,62 ± 0,27	32, 10 ± 3,96	---	---
Ovalbumina	1,96 ± 0,14	4,52 ± 1,13	---	---

Os valores de atividade do anticorpo resultam da média ± desvio padrão de três réplicas.

O anticorpo 2.13 apresentou reconhecimento para as quatro colas animais, sendo inferior na cola de pescada. A atividade de anticorpo apresentada para o aglutinante de pele de coelho foi de 48,45 ± 1,04 U mL^{-1}, seguindo-se a cola de pele de carneiro com uma atividade de 18,42 ± 1,08 U mL^{-1}, o aglutinante de pele de coelho com uma atividade de 16,90 ± 1,24 U mL^{-1} e por último, a cola de pescada com uma atividade de 2,66 ± 0,24 U mL^{-1}. Para os restantes antigénios a cola não mostrou reconhecimento.

O anticorpo 2.17 mostrou reconhecimento especialmente para as colas animais, para a gema e para a albumina comercial. Os valores de atividade para a gema foram de 47,77 ± 5,98 U mL^{-1}, seguindo-se a albumina comercial com 32, 10 ± 3,96 U mL^{-1}. Para as colas comerciais os valores de atividade encontram-se entre 14 e 25 ± desvio padrão U mL^{-1}.

O anticorpo 5.34 apresentou reconhecimento para as quatro colas animais com atividade de anticorpo semelhante. A atividade para a cola pele de coelho foi de

124,87 ± 11,02U mL^{-1}, seguindo a cola de coelho com 114,12 ± 12,66 U mL^{-1}, a cola de pescada com 112,57 ± 9,48 U mL^{-1} e, por último a cola de pele de carneiro com atividade de anticorpo de 99,80 ± 3,87 U mL^{-1}.

De todos os anticorpos que mostraram reconhecimento para a cola animal de pele de coelho o anticorpo 3.14 mostrou ser seletivo para este aglutinante com uma atividade de 90,28 ± 8,65 U mL^{-1}.

4.3.3. Especificidade do anticorpo 3.14 para frações proteicas da cola de pele de coelho

Pela técnica de ELISA efetuou-se um *screening* de reconhecimento das frações proteicas da cola de pele de coelho obtidas pelas técnicas de IEC (Figura 16) e SEC (Figura 20).

A tabela 10 apresenta os valores de reconhecimento obtidos para as frações IEC e SEC, respetivamente.

Tabela 9- Atividade do anticorpo 3.14 na determinação do reconhecimento das frações obtidas por IEC e SEC.

Atividade do anticorpo (U mL^{-1})					
FRAÇÕES IEC					
F_1		**I**		**II**	
5,87 ± 0,75		4,03 ± 1,16		2,60 ± 0,48	
FRAÇÕES SEC					
I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VIII**
4,28 ± 0,42	6,08 ± 0,81	4,88 ± 0,53	3,28 ± 0,20	12,80 ± 2,10	27,80 ± 2,74

Os valores de atividade do anticorpo resultam da média ± desvio padrão de três réplicas.

Nas frações obtidas por IEC, o anticorpo 3.14 mostrou reconhecimento para todas as frações, apresentando maior reconhecimento para a fração F_1, com uma atividade de 5,87 ± 0,75 U mL^{-1}, seguindo-se a fração I com 4,03 ± 1,16 U mL^{-1} e a fração II com

uma atividade de 2,60 ± 0,48 U mL^{-1}. Nas frações obtidas por SEC, o anticorpo 3.14 mostrou reconhecimento para todas as frações testadas, sendo superior nas frações II, V e VIII, onde as atividades foram 6,08 ± 0,81 U mL^{-1}, 12,80 ± 2,10 U mL^{-1} e 27,80 ± 2,74 U mL^{-1}, respetivamente.

Os resultados de *Western Blotting* para as frações IEC podem observar-se na Figura 5.

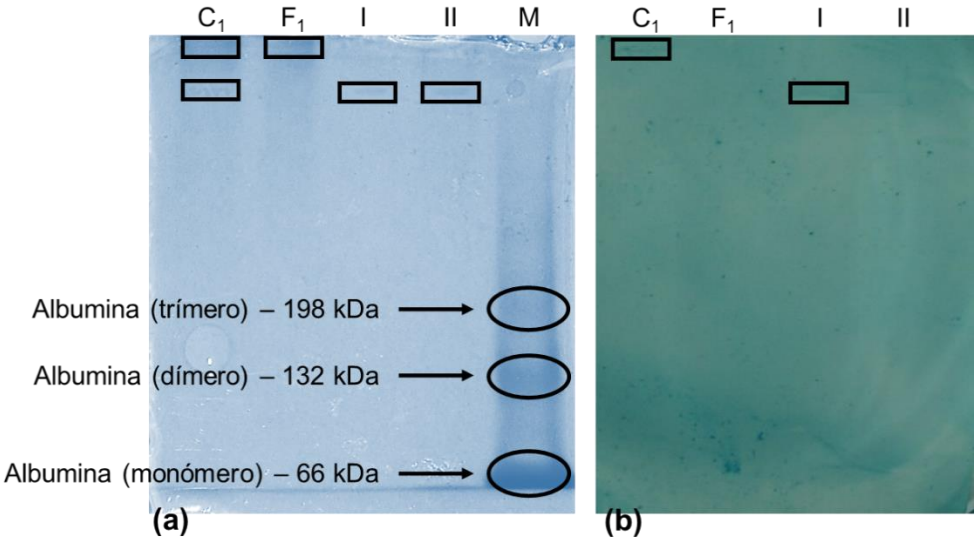

Figura 25- Especificidade do anticorpo 3.14 às frações proteicas por IEC da cola de pele de coelho. (a)- eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes (4%), (b)- membrana de nitrocelulose após incubação com o anticorpo e revelação, C_1- cola de pele de coelho, F_1- fração antes da aplicação do gradiente KCl, I e II- frações IEC, M- BSA.

A cola de pele de coelho apresenta duas bandas proteicas com MM superior a 198 kDa. A fração F_1, bem como as frações recolhidas no gradiente de KCl na IEC, apresentam uma única banda, que correspondem às bandas na cola original. Após processo de transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, foi efetuada a incubação da membrana com o anticorpo 3.14. Verificou-se o reconhecimento do anticorpo na amostra de cola total de pele de coelho e na amostra correspondente à fração I de IEC, parecendo ser esta a proteína responsável pela seletividade do anticorpo produzido.

4.3.4. Ensaios de reconhecimento de colas animais em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete

Os anticorpos que mostraram reconhecimento e especificidade foram utilizados no desenvolvimento de ensaios de miniaturização em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete. Após microamostragem (cerca de 4 mm^2) foi possível otimizar uma metodologia de análise que incluiu a extração da amostra e posterior doseamento por ELISA.

Na tabela 9 estão apresentados os valores de reconhecimento dos anticorpos 2.13 e 3.14 para as diferentes provetes analisadas.

Tabela 10- Atividade dos anticorpos selecionados, indicadora do reconhecimento destes às provetes.

Anticorpo	Atividade do anticorpo (U mL^{-1})		
	Pele de Coelho	Coelho	Pele de Carneiro
2.13	49,21 ± 1,20	16,24 ± 1,04	15,21 ± 1,32
3.14	124,80 ± 19,66	1,89 ± 0,18	1,06 ± 0,14

Os valores de atividade do anticorpo resultam da média ± desvio padrão de três réplicas.

O anticorpo 3.14 foi específico para a provete constituída por pele de coelho, com uma atividade de 124,80 ± 19,66 U mL^{-1}. Para as provetes de coelho e pele de carneiro o anticorpo em estudo não apresentou reconhecimento. O anticorpo 2.13 apresentou atividade para as três provetes, sendo este valor superior na provete pele de coelho.

Estes resultados bastante promissores no que se refere ao anticorpo 3.14 abrem a possibilidade de, num futuro próximo, vir a utilizar este anticorpo e a metodologia desenvolvida em amostras reais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho experimental estudaram-se quatro colas de origem animal largamente utilizadas como aglutinantes em pinturas de cavalete, efetuando a sua caracterização por diferentes métodos e, a sua identificação através de anticorpos específicos.

De uma forma geral, com este trabalho experimental pode concluir-se que:

- Foi possível caracterizar quatro colas animais em estudo (cola de pele de coelho, cola de coelho, cola de pele de carneiro e cola de pescada) quanto ao seu conteúdo proteico, glucídico e lípido, verificando-se que maioritariamente estes aglutinantes são de origem proteica;

- Através de técnicas eletroforéticas e cromatográficas (SEC-UV-RI-HPLC) confirmou-se a presença de proteínas distintas, consoante a origem da cola animal, refletindo também uma diferente composição glucídica das amostras, o que confirma a presença de compostos polissacarídicos nestes aglutinantes;

- Pelos métodos não destrutivos FTIR e Raman, foi possível atribuir bandas específicas a cada tipo de cola;

- Apesar da análise por Raman não possibilitar a distinção na origem da cola animal, visivelmente indica a presença de aglutinantes proteicos;

- Os espetros de FTIR-ATR parecem permitir discriminar as colas entre si;

- O fracionamento proteico das colas animais por IEC e SEC permitiu a separação e caracterização de várias frações proteicas;

- Quatro dos dez anticorpos testados reconheceram a cola de pele de coelho, e o anticorpo 3.14 mostrou especificidade para este aglutinante;

- Desenvolveram-se ensaios de reconhecimento de colas animais em microamostras de provetes de camada de preparação para pinturas de cavalete;

- Os anticorpos 3.14 permitem um reconhecimento seletivo da cola de pele de coelho em provetes de camada de preparação para pintura de cavalete.

Para complementar este trabalho seria ainda interessante:

- Análise de diferentes lotes das colas animais, de forma a validar os resultados obtidos de FTIR e Raman;

- Ensaios dos anticorpos produzidos em matrizes complexas de proteínas e em espécimes envelhecidos, tendo em conta os processos de envelhecimento e presença de pigmentos que podem influenciar esse processo de deteção;

- Aplicar os anticorpos específicos em microamostras reais;

- Produção de um *kit* de fácil aplicação, capaz de identificar de forma rápida, específica e reprodutível cola de pele de coelho em microamostras reais de pinturas;

- Produção de anticorpos dirigidos para outras colas animais.

6. Referências Bibliográficas

Abidi, S.L., 1991. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. Journal of Chromatography A 587: 193-203.

Ahmed, H.E. & Kolisis, F.N., 2012. A study on using of protease for removal of animal glue adhesive in textile conservation. Journal of Applied Polymer Science 124: 3565-3576.

Akon, C.C. & Min, D.B., 2008. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology 3ed. CRC Press.

Albertini, E., Raggi, L., Vagnini, M., Sassolini, A., Achilli, A., Marconi, G., Cartechini, L., Veronesi, F., Falcinelli, M., Brunetti, B. & Miliani, C., 2011. Tracing the biological origin of animal glues used in paintings through mitochondrial DNA analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry 399: 2987-2995.

Arslanoglu, J., Schultz, J., Loike, J. & Peterson, K., 2010. Immunology and art: Using antibody-based techniques to identify proteins and gums in artworks. Journal of Biosciences 35: 3-10.

Arteiro, J., Martins, M., Salvador, C., Candeias, M., A., K. & Caldeira, A., 2012. Protein-Polysaccharides of Trametes versicolor: Production and Biological Activities. Medicinal Chemistry Research 21: 937-943.

Bollag, D., 1994. Ion-Exchange Chromatography, In: Dunn, B., Pennington, M. (Eds.), Peptide Analysis Protocols. Humana Press, pp. 11-22.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Burry, R.W., 2010. Immunocytochemistry. Springer New York.

Cartechini, L., Vagnini, M., Palmieri, M., Pitzurra, L., Mello, T., Mazurek, J. & Chiari, G., 2010. Immunodetection of Proteins in Ancient Paint Media. American Chemical Society 43: 867-876.

Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F.R., Hadjebi, O., Bartrons, R., Ventura, F. & Rosa, J.L., 2006. Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular weights using low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel. Electrophoresis 27: 3935-3938.

Cheng, Y., Zheng, Y. & VanderGheynst, J.S., 2011. Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. Lipids 46: 95-103

Ciferri, O., 1999. Microbial Degradation of Paintings. Applied and Environmental Microbiology 65: 879–885.

Clark, R.J.H., 2005. Raman Microscopy in the identification of pigments on Manuscripts and other Artwork, Scientific Examination of Art: Modern Techniques in Conservation and Analysis. The National Academies Press, pp. 162-169.

Colombini, M.P. & Modugno, F., 2004. Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. Journal of Separation Science 27: 147–160.

Corso, G., Gelzo, M., Chambery, A., Severino, V., Maro, A.D., Lomoriello, F.S., D'Apolito, O., Russo, A.D., Gargiulo, P., Piccioli, C. & Arcari, P., 2012. Characterization of pigments and ligands in a wall painting fragment from Liternum archaeological park (Italy). Journal of Separation Science 35: 2986-2993.

Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B. & Pittman, J.K., 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology 101: 4499–4507.

Deutscher, M.P., 1990. Guide to Protein Purification. Academic Press.

Dolci, L., Sciutto, G., Guardigli, M., Rizzoli, M., Prati, S., Mazzeo, R. & Roda, A., 2008. Ultrasensitive chemiluminescent immunochemical identification and localization of protein components in painting cross-sections by microscope low-light imaging. Analytical and Bioanalytical Chemistry 392: 29-35.

Dorge, V. & Howlett, F.C., 1998. Painted Wood: History and Conservation. Getty Conservation Institute.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Duygu, D., Udoh, A.U., Ozer, T., Akbulut, A., Erkaya, I., Yildiz, K. & Guler, D., 2012. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. African Journal of Biotechnology 11: 3817-3824.

Gilbert, B., Denoel, S., Weber, G. & Allart, D., 2003. Analysis of green copper pigments in illuminated manuscripts by micro-Raman spectroscopy. Analyst 128: 1213-1217.

Hayworth, D., Overview of Protein Electrophoresis. Thermo Scientific.

Heginbotham, A., Millay, V. & Quick, M., 2006. The Use of Immunofluorescence Microscopy (IFM) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) as Complementary Techniques for Protein Identification in Artists' Materials. Journal of the American Institute for Conservation 45: 80-105.

Hurt, P. & Ocon, N., A Primer for the Materials, Methods and Techniques of Conservation.

Javier, J., 2005. An Introduction to Raman Spectroscopy: Introduction and Basic Principles. Infrared Spectroscopy / Raman.

Johnson, J.S. & Bennett, K., 2000. Curatorial Care of Easel Paintings, The Museum Handbook, Part I:Museum Collections, pp. L:2-L:4.

Kaushal, R., Kaur, N., Upadhyay, A., Suri, O.P. & Thakkar, A., 2011. High Performance Liquid Chromatography Detectors - a review International Research Journal Of Pharmacy 2.

Kazarian, S.G. & Chan, K.L.A., 2013. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. Analyst 138: 1940-1951.

Kruger, N.J., 2002. The Bradford Method for Protein Quantitation, In: Walker, J.M. (Ed.), The Protein Protocols Handbook, pp. 15-21.

Liu, W., Li, W., Yin, W., Meng, M., Wan, Y., Feng, C., Wang, S. & Xi, R., 2010. Preparation of a monoclonal antibody and development of an indirect competitive ELISA for the detection of chlorpromazine residue in chicken and swine liver. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 1789-1795.

Lluveras, A., Bonaduce, I., Andreotti, A. & Colombini, M.P., 2010. GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipids, Natural Waxes, Terpenoid Resins, Proteinaceous and Polysaccharide Materials in the Same Paint Microsample Avoiding Interferences from Inorganic Media. Analytical Chemistry 82: 376-386.

Manns, J.M., 2005. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins, Current Protocols in Microbiology. John Wiley & Sons, Inc.

Martin, M. & Guiochon, G., 2005. Effects of high pressures in liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1090(1-2): 16-38.

Martins, S., Karmali, A., Andrade, J., Custódio, A. & Serralheiro, M.L., 2005. Characterization of Monoclonal Antibodies Against Altered (T103I) Amidase From Pseudomonas aeruginosa. Molecular Biotechnology 30: 207-219.

Martins, S., Karmali, A. & Serralheiro, M.L., 2011. Chromatographic behaviour of monoclonal antibodies against wild-type amidase from *Pseudomonas aeruginosa* on immobilized metal chelates. Biomedical Chromatography 25: 1327–1337.

Mazurek, J., Schilling, M. & Chiari, G., 2008. Antibody assay to characterize binding media in paint. ICOM Committee for Conservation 2: 678-685.

Mikkelsen, S.R. & Cortón, E., 2004. Bioanalytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc.

Mori, S. & Barth, H.G., 1999. Size Exclusion Chromatography. Springer.

Na, Y.S., Kim, W.J., Kim, S.M., Park, J.K., Lee, J.M., Kim, S.O., Synytsya, A. & Park, Y.I., 2010. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. International Immunopharmacology 10: 364–370.

Palmieri, M., Vagnini, M., Pitzurra, L., Brunetti, B.G. & Cartechini, L., 2013. Identification of animal glue and hen-egg yolk in paintings by use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analytical and Bioanalytical Chemistry 405: 6365-6371.

Palmieri, M., Vagnini, M., Pitzurra, L., Rocchi, P., Brunetti, B.G., Sgamellotti, A. & Cartechini, L., 2011. Development of an analytical protocol for a fast, sensitive and specific protein recognition in paintings by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analytical and Bioanalytical Chemistry 399: 3011-3023.

Pandey, S., 2010. Hybridoma Technology for Production of Monoclonal Antibodies. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 1: 88-94.

PerkinElmer, 2005. FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). PerkinElmer Life and Analytical Sciences.

PikeTechnologies, 2011. ATR- Theory and Applications. PikeTechnologies.

Postma, T. & Stroes, J.A.P., 1968. Lipid screening in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 22: 569-578.

Rimmelin, A.M., 2006. Size Exclusion Cgromatography. John Jay's Finest XI: 5-13.

Rivers, S. & Umney, N., 2003. Conservation of Furniture. Butterworth Heinemann.

Salvador, C., Martins, M.R., Candeias, M.F., Karmali, A., Arteiro, J.M. & Caldeira, A.T., 2012. Characterization and Biological Activities of Protein-Bound Polysaccharides Produced by Cultures of Pleurotus ostreatus. Journal of Agricultural Science and Technology A 2: 1296-1306.

Schellmann, N.C., 2007. Animal glues: a review of their key properties relevant to conservation. Reviews in Conservation 8: 55-66.

Schultz, J. & Petersen, K., 2011. Antibody-Based Techniques to Distinguish Proteins and Identify Sturgeon Glue in Works of Art. Proceedings of Symposium 2011 – Adhesives and Consolidants for Conservation.

Sciutto, G., Dolci, L., Buragina, A., Prati, S., Guardigli, M., Mazzeo, R. & Roda, A., 2011. Development of a multiplexed chemiluminescent immunochemical imaging technique for the simultaneous localization of different proteins in painting micro cross-sections. Analytical and Bioanalytical Chemistry 399: 2889-2897.

Sciutto, G., Dolci, L.S., Guardigli, M., Zangheri, M., Prati, S., Mazzco, R. & Roda, A., 2012. Single and multiplexed immunoassays for the chemiluminescent imaging detection of animal glues in historical paint cross-sections. Analytical and Bioanalytical Chemistry.

Sheehan, D. & FitzGerald, R., 1996. Ion-Exchange Chromatography, In: Doonan, S. (Ed.), Protein Purification Protocols. Humana Press, pp. 145-150.

Siddiqui, M.Z., 2010. Monoclonal Antibodies as Diagnostics; an Appraisal. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 71: 12-17.

Sjahfirdi, L., Mayangsari & Nasikin, M., 2012. Protein idetification using Fourier Tranform Infrared (FTIR). International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences 10: 418-421.

Stuart, B.H., 2007. Analytical Techniques in Materials Conservation. John Wiley & Sons, England.

Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Spevácek, J., Erban, V., Kováríková, E. & Copíková, J., 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers 76: 548–556.

ThermoNicolet, 2001. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. Thermo Nicolet Corporation.

Tyagi, S., Sharma, P.K., Kumar, N. & Visht, S., 2011. Hybridoma Technique in Pharmaceutical Science. International Journal of PharmTech Research 3: 459-463.

Vandenabeele, P., Wehling, B., Moens, L., Edwards, H., Reu, M. & Hooydonk, G.V., 2000. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. Analytica Chimica Acta 407: 261–274.

Wilson, K. & Walker, J.M., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7 ed. Cambridge University Press.

Xiang, Y., Liu, Y. & Lee, M.L., 2006. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. Journal of Chromatography A 1104: 198-202.

Zhou, Y., Li, C.-Y., Li, Y.-S., Ren, H.-L., Lu, S.-Y., Tian, X.-L., Hao, Y.-M., Zhang, Y.-Y., Shen, Q.-F., Liu, Z.-S., Meng, X.-M. & Zhang, J.-H., 2012. Monoclonal antibody based inhibition ELISA as a new tool for the analysis of melamine in milk and pet food samples. Food Chemistry 135: 2681-2686.

7. ANEXOS

Anexo A- Metodologias aplicadas

I-1.Técnicas Eletroforéticas

A eletroforese em gel é uma técnica em que as moléculas são forçadas, por corrente elétrica, a atravessar a matriz de um gel, onde são separadas consoante as suas propriedades físicas (como carga ou peso molecular) (Hayworth; Wilson & Walker, 2010). As proteínas são comumente separadas utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para identificação de proteínas individuais em amostras complexas, ou para observar múltiplas proteínas em amostras simples. Os géis de poliacrilamida utilizados são um suporte onde os monómeros de acrilamida, ao polimerizarem, formam cadeias longas que se ligam entre si por ligações cruzadas (*crosslinking*) com resíduos de bisacrilamida. A polimerização do gel ocorre pela reação iniciada pelo persulfato de amónio (APS) e catalisada pelo N, N, N', N'-tetrametilinediamina (TEMED). O tamanho dos poros formados durante a polimerização do gel depende essencialmente da quantidade de acrilamida presente e, também, da quantidade de bisacrilamida para formar o *crosslinking*. Assim, quanto maior a concentração em acrilamida, mais apertada a malha do gel e menor são os poros formados (Casas-Terradellas et al., 2006; Hayworth; Manns, 2005; Wilson & Walker, 2010).

Existem várias formas de PAGE que fornecem diferentes informações sobre as proteínas: PAGE- Nativa, ou em condições não desnaturantes, que separa as proteínas de acordo com a sua relação carga/ peso molecular e, SDS- PAGE, ou em condições desnaturantes, que separa primariamente pelo peso molecular.

I-1.1. PAGE- Nativa

A PAGE- Nativa, ou seja, em condições não desnaturantes, permite a separação das proteínas de acordo com a sua carga e com o seu peso molecular, baseando-se na estrutura nativa destas. As proteínas possuem uma carga negativa, pelo que na eletroforese quanto maior a densidade de cargas na proteína, mais rapidamente a proteína migrará. Simultaneamente os poros do gel permitem uma separação de acordo com o tamanho e a estrutura tridimensional da proteína. Neste tipo de eletroforese algumas proteínas conseguem manter a sua atividade, pelo que pode utilizar-se a PAGE-Nativa para preparação de proteínas purificadas ativas. Estas podem ser recuperadas do gel nativo por métodos de difusão passiva ou por eletroeluição (Hayworth; Wilson & Walker, 2010).

I-1.2. SDS- PAGE

A SDS- PAGE é um tipo de eletroforese em condições desnaturantes, que utiliza o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniónico, como agente desnaturante. O SDS tem a função de se ligar às proteínas, desnaturadas pelo calor, conferindo-lhes uma carga negativa proporcional ao seu tamanho. A eletroforese em condições desnaturantes permite a separação de proteínas pelo seu peso molecular (Casas-Terradellas et al., 2006; Deutscher, 1990; Wilson & Walker, 2010).

A análise por SDS- PAGE permite o acompanhamento da purificação de proteínas. Uma proteína pura revela uma única banda no gel, exceto se for constituída por subunidades de tamanhos distintos (Wilson & Walker, 2010).

I-2. Técnicas Espetroscópicas

I-2.1. FTIR-ATR

A espetroscopia de infravermelho (IR) tem sido uma técnica bastante utilizada para a análise de materiais, quer sejam sólidos, líquidos ou gasosos, por meio de transmissão de radiação infravermelha diretamente através da amostra. O espetro de infravermelho permite a caracterização das amostras pelos picos de absorção obtidos, correspondentes à frequência das vibrações entre as ligações dos átomos que compõem o material. Cada material é uma combinação única de átomos pelo que os espetros produzidos são diferentes de amostra para amostra. A intensidade dos picos vai depender da espessura da amostra, quando esta se encontra no estado sólido ou líquido (PerkinElmer, 2005; Stuart, 2007; ThermoNicolet, 2001).

A espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é o método preferido da espetroscopia de infravermelho, pois comparando com os métodos antigos de análise deste tipo de espetros, esta técnica possui as vantagens de ser não destrutiva, onde se consegue identificar e distinguir facilmente compostos orgânicos e inorgânicos. A espetroscopia FTIR é ainda um método preciso, sem necessitar de uma calibração externa, onde as medidas são rápidas e sensíveis, pois esta técnica utiliza amostras pequenas (máximo de 2 mm^3), suficientes para cobrir a janela de diamante, conseguindo detetar ainda concentrações pequenas de contaminantes (Colombini & Modugno, 2004; Kazarian & Chan, 2013; Stuart, 2007; ThermoNicolet, 2001).

A refletância total atenuada (Corso et al.) é uma ferramenta amostral da técnica de FTIR que permite uma análise quantitativa e qualitativa de amostras sem uma preparação amostral significante. Outra vantagem é a oportunidade de medir amostras que absorvam fortemente no espetro de IR, tais como os sistemas aquosos, tendo ainda a habilidade de aumentar a resolução espacial da imagem medida (Corso et al., 2012; Kazarian & Chan, 2013; PikeTechnologies, 2011).

Figura 26- Módulo FTIR- ATR utilizado na análise espetroscópica das colas animais para estudo da sua composição.

I-2.2. µ-Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica de alta resolução que envolve medições espetrais baseadas na dispersão da radiação monocromática incidida na amostra, permitindo retirar informações químicas e estruturais desta, levando à sua identificação. De uma forma geral, as bandas obtidas são fracas podendo ser ocultadas por efeitos de ressonância, como por exemplo fluorescência proveniente da amostra ou de componentes externos a esta. (Javier, 2005; Stuart, 2007).

A espetroscopia µ-Raman é um método analítico muito utilizado na análise de pigmentos pois combina a sua sensibilidade e especificidade, sendo um método não destrutivo e possível de aplicar *in situ*. Esta técnica é ainda uma importante ferramenta para a caracterização de resinas, assim como para a identificação de aglutinantes e vernizes nas pinturas (Clark, 2005; Gilbert et al., 2003; Stuart, 2007).

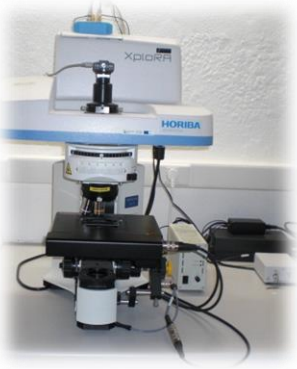

Figura 27- Espetrómetro utilizada na análise da composição das colas animais pela técnica de espetroscopia µ-Raman.

I-3. Técnicas Cromatográficas

I-3.1. HPLC

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) é uma variante da cromatografia em coluna, bastante utilizada para separar, identificar e quantificar compostos em amostras (Martin & Guiochon, 2005). A técnica utiliza elevada pressão para forçar o solvente (fase móvel) a passar pela coluna de separação (fase estacionária) que contém finas partículas promovendo uma separação de alta resolução. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária movem-se lentamente através da fase móvel, enquanto os componentes que não possuem afinidade para a fase estacionária são eluídos rapidamente. Na saída da coluna pode estar incluído um detetor que analisa o tempo de retenção das moléculas. Este tempo varia consoante a afinidade das moléculas para a fase estacionária, originando bandas num cromatograma que podem ser analisadas qualitativa ou quantitativamente (Stuart, 2007; Xiang et al., 2006).

Existem vários tipos de separação que se pode efetuar pela técnica de HPLC consoante a coluna utilizada. A separação pode ser feita por cromatografia de fase normal e por cromatografia de fase reversa (separação com base na polaridade), cromatografia de bio- afinidade (separação com base na interação reversível específica das proteínas com ligandos), cromatografia de troca iónica (separação pela carga das partículas) e cromatografia de exclusão molecular (separação pelo tamanho das partículas da amostra) (Abidi, 1991).

Após atravessar a coluna de separação, as partículas chegam aos detetores. Existem vários tipos de detetor, tendo sido neste caso utilizados um detetor de índice de refração (RI) e um detetor de ultravioleta (Lluveras et al.). O detetor RI pode ser útil na determinação de compostos não- iónicos, que não absorvem na região do UV. O detetor UV, por sua vez, permite a deteção de compostos orgânicos (Kaushal et al., 2011).

Figura 28- Equipamento HPLC, composto pela bomba com injetor *loop*, detetor de UV e detetor de RI, utilizada na análise da composição das colas animais.

I-3.2. IEC

As proteínas contêm grupos carregados na sua superfície que levam ao aumento da sua interação com a água, influenciando assim a sua solubilidade. A um determinado pH fisiológico, algumas destas proteínas são catiónicas (carregadas positivamente) e outras aniónicas (carregadas negativamente). Quando a um certo pH fisiológico se atinge o equilíbrio entre as cargas negativas e positivas, pode afirmar-se que se atingiu o ponto isoelétrico (pI). Como as proteínas se diferenciam umas das outras na sequência de aminoácidos, a carga líquida que cada uma possui a um certo pH fisiológico é determinada pelo balanço destas duas cargas (por exemplo, se o pH fisiológico é inferior ao pI, a carga líquida das proteínas é positiva) (Sheehan & FitzGerald, 1996).

A cromatografia de troca iónica (IEC) permite a separação de proteínas pelo seu tipo de carga (aniónico ou catiónico) e pela força desta (por exemplo, fortemente aniónico ou fracamente aniónico). A base desta técnica é a de que iões carregados podem trocar-se livremente com iões do mesmo tipo, ou seja, no caso de uma resina de troca aniónica, a proteína ao atravessar a coluna vai ocupar os locais de ligação do ião Cl^-, ficando esta ligada à resina. Tal como a maioria das cromatografias por coluna,

a cromatografia de troca iónica requer uma fase estacionária. Esta é composta por polímeros insolúveis como a celulose ou *Sephadex*. Os compostos que ficam ligados à fase estacionária são posteriormente eluídos da coluna através de uma eluição de gradiente ou por uma eluição isocrática, através da alteração da concentração de sais ou do pH (Bollag, 1994; Sheehan & FitzGerald, 1996; Stuart, 2007).

Figura 29- Coluna adaptada para fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais por IEC.

I-3.3. SEC

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) permite a separação de moléculas baseando-se no seu tamanho, sendo esta técnica utilizada para purificar proteínas e/ ou outras moléculas, e estimar o peso molecular de proteínas desconhecidas. Ao contrário de outras cromatografias de separação, neste caso não ocorre reações químicas entre as proteínas e a fase estacionária, preservando assim, a eficiência da coluna e a integridade da proteína.

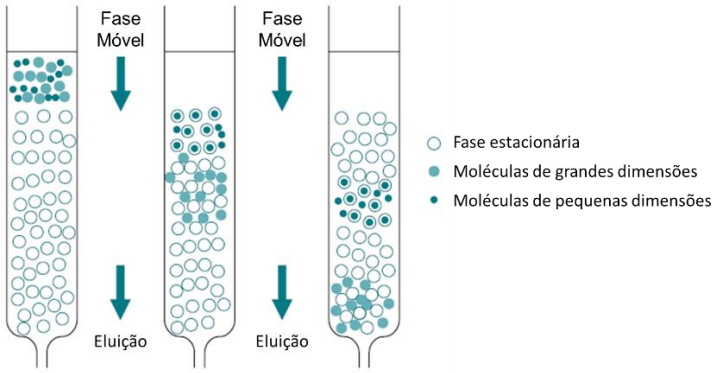

Figura 30- Esquema ilustrativo da separação de moléculas de diferentes dimensões por cromatografia de exclusão. As moléculas de grandes dimensões são eluídas inicialmente no volume de exclusão da coluna (adaptado Wilson & Walker, 2010).

Tal como em outras técnicas, a SEC necessita de uma fase estacionária, sendo esta composta por esferas de poliacrilamida extremamente porosas e hidrofílicas que vão permitir a separação das moléculas, e uma fase móvel de forma a mover a amostra pela coluna. Assim, macromoléculas que não consigam penetrar nos poros vão permanecer na fase móvel, atravessando rapidamente a coluna, sendo eluídas em primeiro lugar. As restantes moléculas vão sendo eluídas consoante a sua capacidade de penetrar em alguns, ou em todos os poros (Mori & Barth, 1999; Rimmelin, 2006).

Figura 31- Coluna utilizada no fracionamento das proteínas maioritárias das colas animais por SEC.

I-4. Técnicas Imunológicas

O princípio básico de qualquer técnica imunológica é a de que um anticorpo específico irá combinar-se com um antigénio em particular, originando um complexo exclusivo anticorpo- antigénio (Wilson & Walker, 2010).

Os componentes estranhos ao organismo são designados antigénios. Estes desencadeiam uma resposta imunológica de produção de anticorpos específicos quando entram em contato com o sistema imunitário. Os antigénios normalmente têm elevado peso molecular, podendo ser proteínas, polissacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, entre outros materiais. A resposta provocada no sistema imunitário é variável e depende da estrutura, tamanho e constituição destes (Wilson & Walker, 2010).

Os anticorpos, conhecidos como imunoglobulinas, são proteínas presentes no organismo e indispensáveis a estes, pois detetam e neutralizam os antigénios. Os anticorpos são glicoproteínas secretadas pelos linfócitos B, solúveis em água e que circulam na corrente sanguínea, constituindo cerca de 20% da proteína total do soro (Burry, 2010; Wilson & Walker, 2010).

I-4.1. ELISA

A técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) aplicada a bens patrimoniais combina a especificidade dos anticorpos com a sensibilidade dos ensaios enzimáticos (Mazurek et al., 2008). A técnica utiliza anticorpos conjugados com enzimas como agente de deteção, que ao atuarem com substratos cromogéneos ou fluorogéneos, produzem e amplificam um sinal detetável (Cartechini et al., 2010).

A técnica de ELISA pode operar de duas formas, direta e indireta, consoante a forma de deteção. Enquanto no método direto o anticorpo primário é conjugado com enzimas que emitem o sinal a detetar, no ELISA indireto (Figura 32) existe um segundo anticorpo, específico para a classe do primeiro, conjugado com o enzima

(Cartechini et al., 2010). Quando comparada com outros métodos de identificação já estudados, a técnica possui vantagens pois requer um tratamento prévio mínimo da amostra, é uma técnica rápida e tem custos mínimos. Este método é sensível e específico, sendo capaz de identificar a origem da proteína e identificá-la numa mistura complexa utilizando microamostras. Por outro lado existe a desvantagem de ser necessário existir anticorpos específicos para a proteína em estudo (Mazurek et al., 2008; Palmieri et al., 2013; Palmieri et al., 2011).

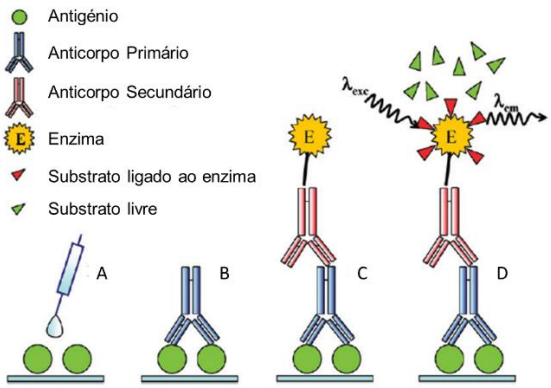

Figura 32- Esquema ilustrativo do método ELISA indireto, utilizado na análise dos anticorpos produzidos para a cola de pele de coelho. A- o antigénio (aglutinantes ou amostra de provete) é colocada no poço da placa, diluído em tampão; B- adição do anticorpo produzido para o antigénio em estudo; C- adição de um segundo anticorpo, específico para o primeiro, conjugado com um enzima; D- adição do substrato p-nPP que vai reagir com o enzima formando um produto de coloração amarelo (adaptado Cartechini et al., 2010).

I-4.2. *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting*, também denominada de *immunoblotting*, é utilizada para identificar proteínas específicas, utilizando anticorpos. O método divide-se em três fases principais: eletroforese das amostras, transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Figura 33) e, por último, deteção das proteínas através de anticorpos (Figura 34). (Mikkelsen & Cortón, 2004; Wilson & Walker, 2010).

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose ocorre por um método designado *electroblotting*, onde é realizada uma *sandwich* do gel e da membrana, sendo depois comprimidos numa cassete e colocados entre dois elétrodos. A corrente elétrica entre eles fará com que as proteínas migrem do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.

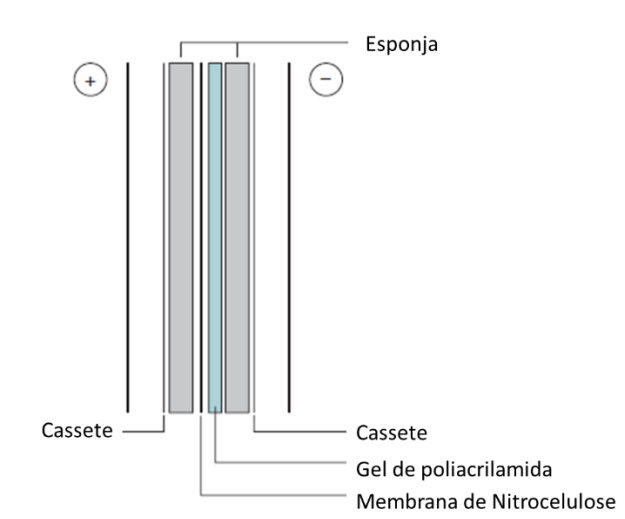

Figura 33- Esquema ilustrativo da montagem do sistema de transferência por *electroblotting*. (adaptado Wilson & Walker, 2010).

Na deteção das proteínas é utilizado um anticorpo para identificar a proteína específica. Após a transferência a membrana é tratada como uma solução bloqueadora, normalmente BSA, de forma a evitar ligações não específicas entre a membrana e o anticorpo. A análise é efetuada tendo a mesma base técnica da ELISA, onde após a incubação com o anticorpo primário produzido, segue-se uma incubação com um segundo anticorpo específico para o primeiro e conjugado com uma enzima, para revelação após a adição do substrato. A reação é observável pelo aparecimento de bandas azul violeta, e é parada com a lavagem das membranas com água miliQ (Mikkelsen & Cortón, 2004; Wilson & Walker, 2010).

Anexo B- Soluções

- **Acrilamida- Bisacrilamida (8: 0,8)**

Para 50 mL pesar 4 g de acrilamida e 0,4 g de bisacrilamida e dissolver em H_2O destilada. Armazenar a 4°C.

- **Azul de Coomassie G- 250 0,6% em HCl 0,6 N (para determinação de proteína)**

Para 100 mL pesar 0,06 g de azul de coomassie G- 250 e dissolver em HCl 0,6 N (4,96 mL de HCl concentrado em 100 mL de H_2O). Armazenar 25°C.

- **Azul de Coomassie R 1,25%**

Para 500 mL medir 200 mL de azul de coomassie R a 1,25% (para 200 mL pesar 2,5 g de azul de coomassie R e dissolver em H_2O destilada), 250 mL de metanol e 50 mL de ácido acético. Armazenar a 25°C.

- **Persulfato de amónio 1,5%**

Para 10 mL pesar 0,15 g de persulfato de amónio e dissolver em H_2O destilada. NOTA: Preparar na hora de preparar o gel.

- **PBS 10x**

Para 1 L pesar 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na_2HPO_4 e 2,4 g de KH_2PO_4. Dissolver em água destilada e acertar o pH a 7,4. Após autoclavar a solução, armazenar a 25°C.

- **SDS 10%**

Para 10 mL pesar 1 g de SDS e dissolver em H_2O destilada. Armazenar a 4°C.

- **Solução de diferenciação para descorar gel (H_2O: metanol: ácido acético- 6: 3: 1)**

Para 100 mL medir 60 mL de H_2O destilada, 30 mL de metanol e 10 mL de ácido acético. Armazenar a 25°C.

- **Solução fixadora (*Western Blotting*): 2% BSA e 0,01% Azida de sódio em TTBS**

Para 100 mL pesar 2 g de BSA e 0,1 g de Azida de sódio, e dissolver em TTBS (não perfazer o balão volumétrico). Colocar no banho aquecido para dissolver a gelativa, e por último acertar o balão. Armazenar a 25°C.

- **Tampão de aplicação para PAGE- Nativa**

Para 20 mL pesar 0,4 mg de azul de bromofenol sal sódico e adicionar 2 mL de glicerol a 87% (glicerina pura). Perfazer o volume com tampão Tris- HCl 62,5 mM pH 6,8 (para 25 mL pesar 0,189 g de Tris, dissolver em H_2O destilada e acertar o pH a 6,8 com HCl 1M.

- **Tampão de aplicação para SDS- PAGE**

Para 20 mL medir e perfazer o restante volume com H_2O destilada. Armazenar a 4°C.

  - 1,25 mL de solução de azul de bromofenol sal sódico a 0,1% (para 5 mL pesar 0,005 g e dissolver em H_2O);
  - 4 mL de glicerol a 87% (glicerina pura);
  - 2 mL de β-mercaptoetanol;
  - 8 mL de SDS a 10%;
  - 4 mL de Tris- HCl 0,5 M a pH 6,5 (para 10 mL pesar 0,605 g de Tris e dissolver em H_2O destilada e acertar o pH a 6,5 com HCl 1M).

- **Tampão de eletroforese: Tris 25 mM contendo glicina 0,192 M a pH 8,3 (PAGE- Nativa)**

Para 1 L pesar 3,03 g de Tris e 14,4 g de Glicina. Dissolver H_2O destilada e acertar o pH a 8,3 com HCl 1 M. Armazenar a 4°C.

- **Tampão de eletroforese: Tris 25 mM contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% a pH 8,3 (SDS- PAGE)**

Para 1 L pesar 3,03 g de Tris, 14,4 g de Glicina e 1 g de SDS. Dissolver H_2O destilada e acertar o pH a 8,3 com HCl 1 M. Armazenar a 4°C.

- **Tampão do gel de concentração: Tris- HCl 0,5 M pH 6,8**

Para 50 mL pesar 3,028 g de Tris e dissolver em H_2O destilada. Acertar o pH a 6,8 com HCl 1 M. Armazenar a 4°C.

- **Tampão do gel de resolução: Tris- HCl 3M pH 8,8**

Para 50 mL pesar 18,17 g de Tris e dissolver em H_2O destilada. Acertar o pH a 8,8 com HCl 1M. Armazenar a 4°C.

- **Tampão glicina 0,1 M, pH 10,4 com 1 mM de $MgCl_2$ e 1 mM de $ZnCl_2$**

Para 1 L pesar 7,5 g de Glicina, 0,202 g de $MgCl_2.H_2O$ e 0,1363 g de $ZnCl_2.H_2O$. Dissolver em água e acertar o pH a 10,4. Armazenar a 25°C.

- **Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6**

Para 1 litro pesar 6,8046 g de KH_2PO_4 (dihidrogenofosfato de potássio) e dissolver em H_2O destilada. Acertar o pH a 6 com KOH 1 M.

- **Tampão fosfato de potássio 50 mM com KCl 1 M, pH 6**

Para 1 litro pesar 6,8046 g de KH_2PO_4 e 74,5513 g de KCl. Dissolver em H_2O destilada. Acertar o pH a 6 com KOH 1 M.

- **Tampão fosfato de potássio 50 mM com KCl 2 M, pH 6**

Para 500 mL pesar 3,4023 g de KH_2PO_4 e 74,5513 g de KCl. Dissolver em H_2O destilada. Acertar o pH a 6 com KOH 1 M.

- **Tampão transferência (Western Blotting): Tris 25 mM com Glicina 0,192 M a pH 8,3**

Para 1 L pesar 3,03 g de Tris e 14,4 g de Glicina, e dissolver em H_2O destilada. Não adicionar ácidos ou base. Armazenar a 25°C.

- **Tampão Tris: Tris 100 mM com NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM, pH 9,55**

Para 1 L pesar 12,114 g Tris e 5,844 g de NaCl. Dissolver em H_2O e acertar o pH a 9,55. Armazenar a 4°C.

- **TTBS: Tris HCl 20 mM pH 7,5 com NaCl 0,15 mM e *Tween* 20 0,05% (v/v)**

Para 1 L pesar 2,4228 g Tris e 0,0088 g NaCl, dissolver em H_2O. Adicionar 0,5 mL de *Tween* 20 e acertar o pH a 7,5 com HCl. Armazenar a 25°C.

- **Vanilina/ ácido fosfórico 17%**

Para 10 mL pesar 2 mg de vanilina e dissolver em ácido fosfórico 17%.

Anexo C- Curvas de Calibração para determinação do conteúdo proteico, glucídico e lipídico das colas animais e das frações obtidas por IEC e SEC

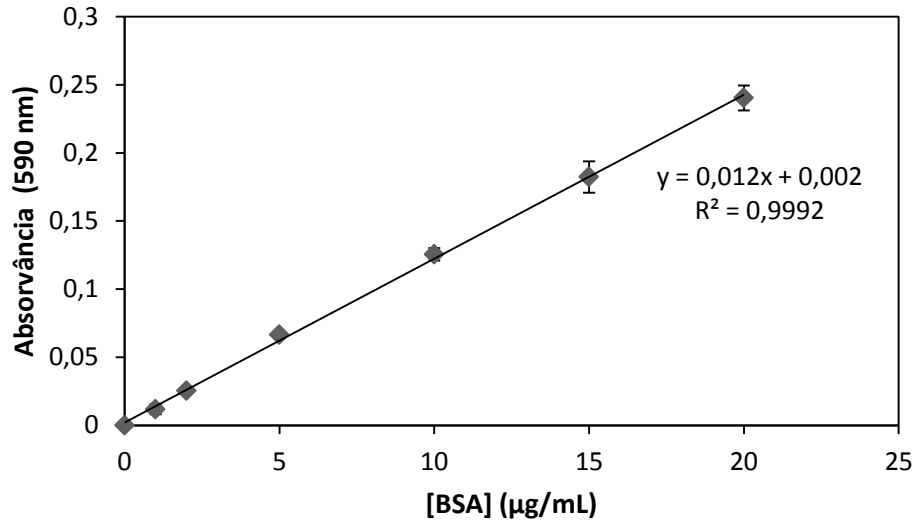

Figura 34- Curva de calibração utilizando BSA como padrão para quantificação de proteínas. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

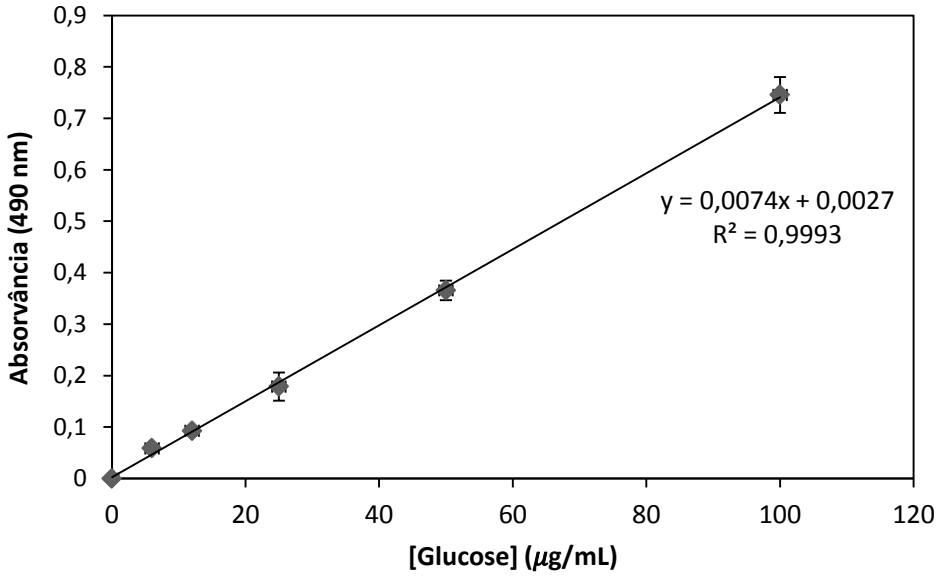

Figura 35- Curva de calibração utilizando a glucose como padrão, para quantificação de glúcidos. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

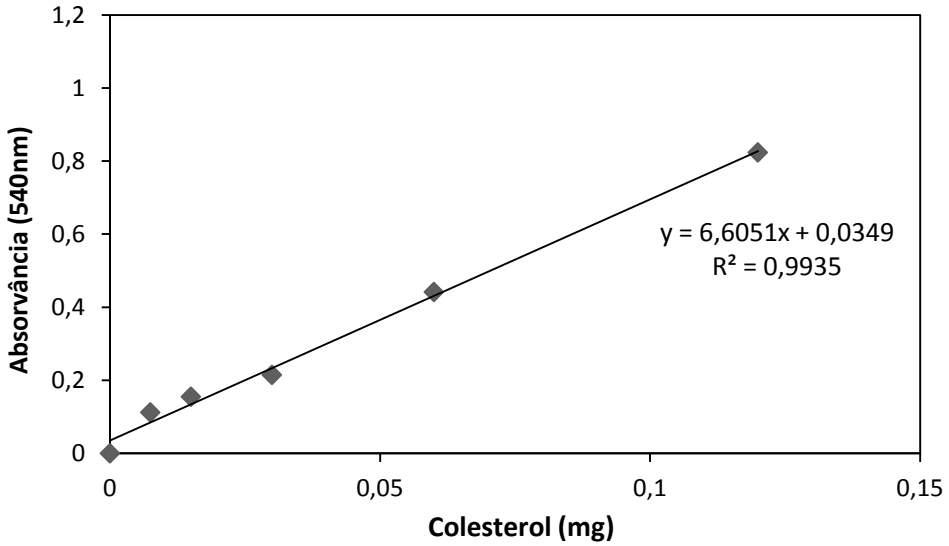

Figura 36- Curva de calibração utilizando colesterol como padrão, para quantificação de lípidos. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

Anexo D- Curvas de Calibração para o estudo da composição das colas animais por HPLC

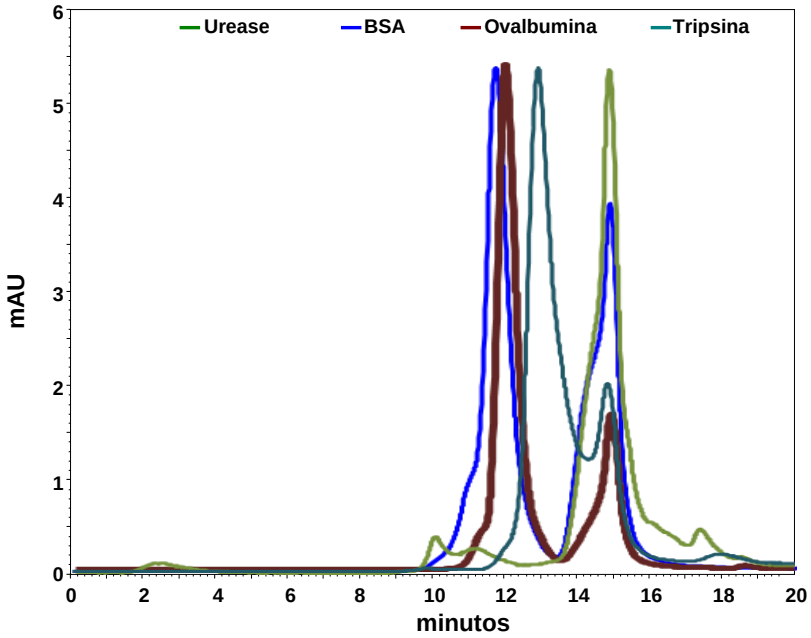

Figura 37- Perfil de UV dos compostos proteicos para os padrões proteicos urease, BSA, ovalbumina e tripsina com MM de 480, 66, 45 e 20,1 kDa, respetivamente, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC.

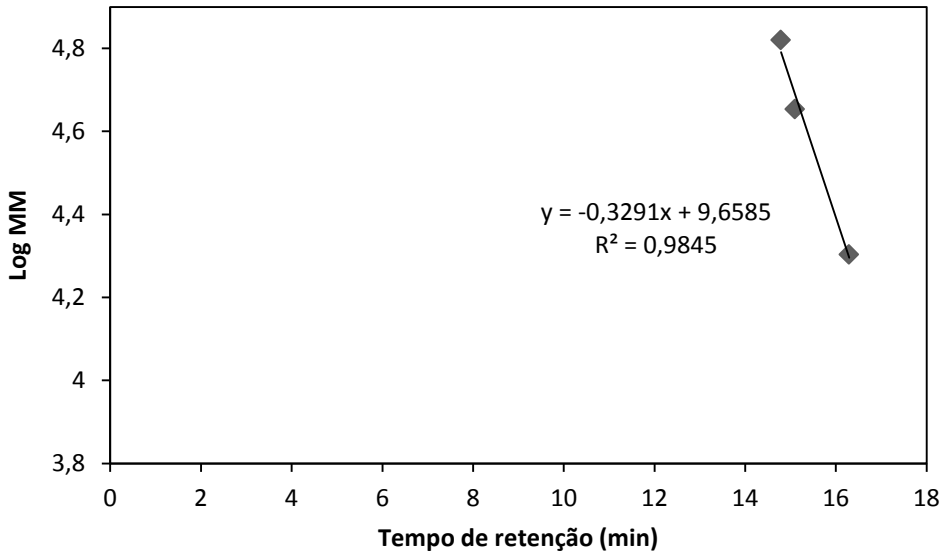

Figura 38- Curva de calibração com os padrões proteicos BSA, ovalbumina e tripsina para análise por HPLC.

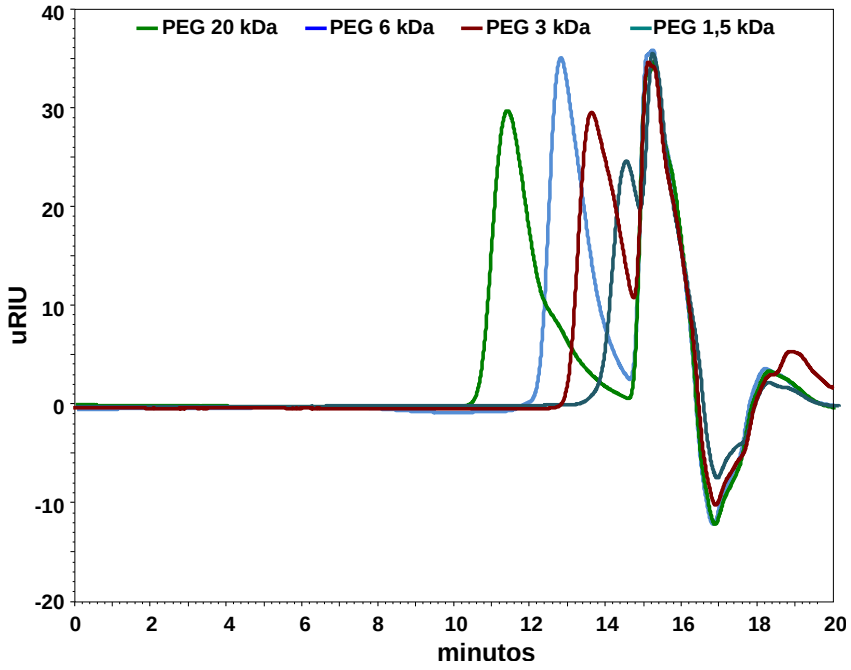

Figura 39- Perfil de RI dos compostos polietilenoglicol (PEG) com MM de 20, 6, 3 e 1.5 kDa, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC.

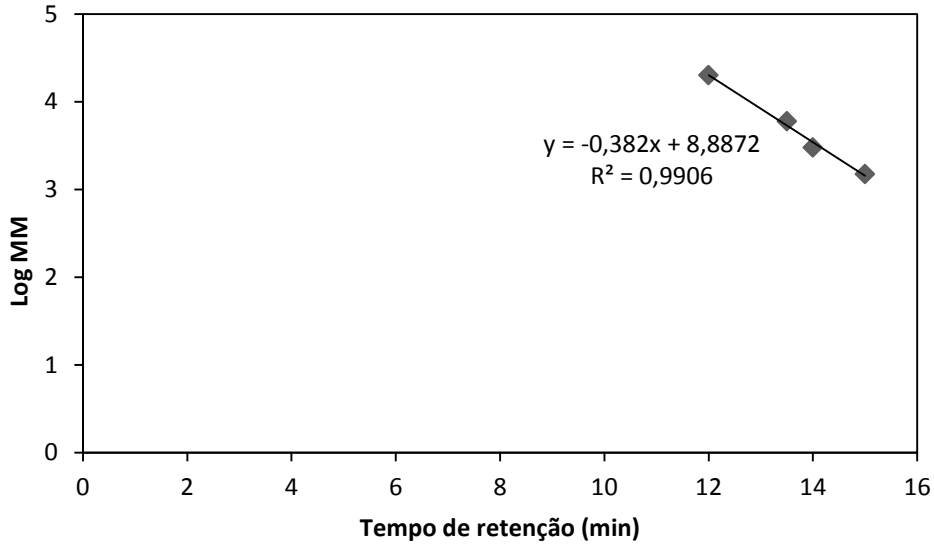

Figura 40- Curva de calibração de padrões PEG para análise por HPLC.

Anexo E- Curvas de Calibração para determinação da MM proteica nas frações SEC

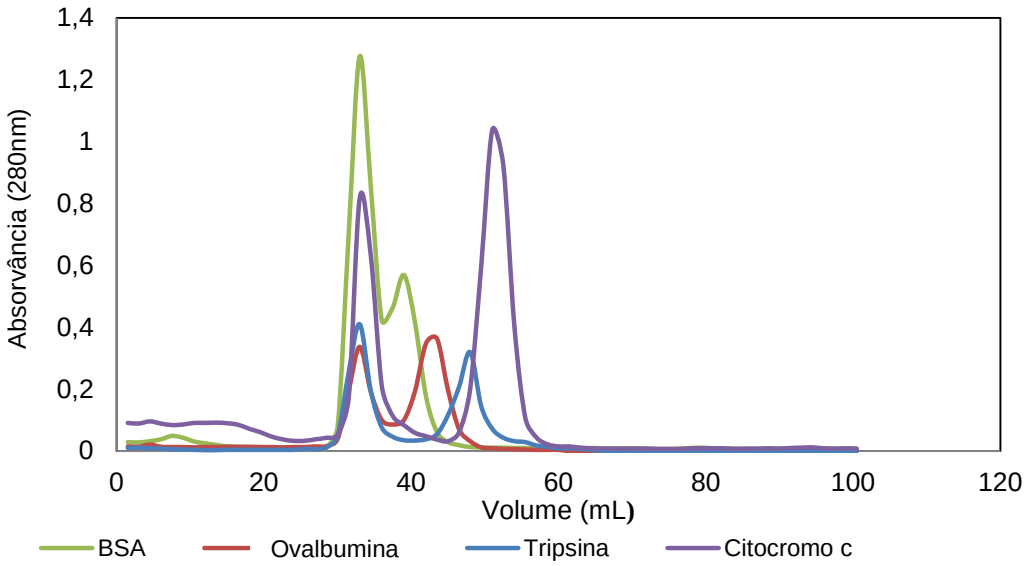

Figura 41- Perfil cromatográfico dos compostos proteicos BSA, ovalbumina, tripsina e citocromo c analisando por SEC utilizado *Sephacryl S-100* como fase estacionária.

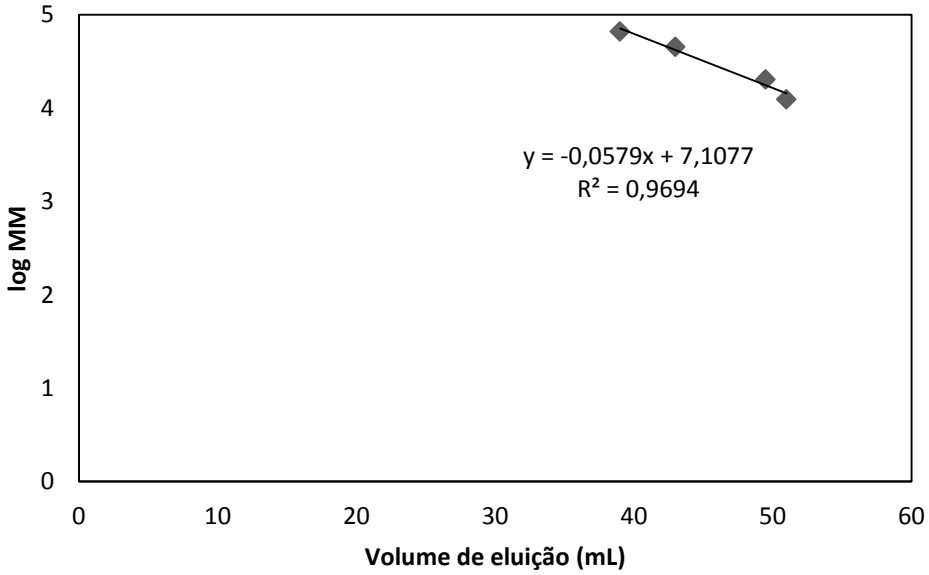

Figura 42- Curva de calibração com padrões de BSA, Ovalbumina, Tripsina e Citocromo C, para determinação de MM na técnica de SEC.