

Andressa Camargo Valse

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO RÁPIDO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE
FENILALANINA, TRIPTOFANO, HISTIDINA E TIROSINA EM
CEREAIS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA
MICELAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito final à
obtenção do título de Mestre em
Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana
Carolina de Oliveira Costa

Florianópolis, SC
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Camargo Valesse, Andressa

Desenvolvimento, otimização e validação de método rápido para análise simultânea de fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina em cereais por cromatografia eletrocínética micelar [dissertação] / Andressa Camargo Valesse ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa - Florianópolis, SC, 2012.

182 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Cromatografia eletrocínética micelar. 3. Aminoácidos. 4. Validação intralaboratorial. 5. Planejamento fatorial. I. Oliveira Costa, Ana Carolina de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Andressa Camargo Valesse

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO RÁPIDO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE
FENILALANINA, TRIPTOFANO, HISTIDINA E TIROSINA EM
CEREAIS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA
MICELAR**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 14 de setembro de 2012.

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett,
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª. Ana Carolina de Oliveira Costa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.Dr. Gustavo Amadeu Micke
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª Dr^ª. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha mãe e ao meu pai, por me amarem incondicionalmente, pelos seus esforços, dedicação, pelos “puxões” de orelha e, principalmente por sempre acreditarem em mim e me darem forças pra seguir em frente, mesmo quando nem eu acreditava. Amo vocês!

Ao meu irmão que é base da minha vida, agradeço por sempre estar ao meu lado. Amo você muito!

Um agradecimento mais que especial para minha orientadora, professora Dr. Ana Carolina O. Costa, que é um ser humano raro de coração e de caráter. Muito obrigada por sua dedicação de forma exaustiva, seus ensinamentos, amizade e principalmente por me ensinar que ninguém está sozinho, somos um grupo! Com certeza você foi muito importante para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por sempre acreditar e confiar em mim!

Ao professor Dr. Gustavo A. Micke o “culpado” de tudo, que foi quem me ensinou e incentivou a começar e a seguir na pesquisa acadêmica. Muito obrigado por todo seu conhecimento transmitido, por sua amizade e dedicação.

À professora Dr. Roseane Fett, por toda confiança e por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Química de Alimentos pelo excelente local de trabalho: Mônia, Graci, Ismael, Renata, Heloísa, Luciano V., Fabiana, Fabíola e Priscila. As meninas da iniciação científica que me ajudaram muito nesta parte final do trabalho: Andréia, Isis, Silu e Gabriela. E um agradecimento mais que especial ao

nosso “guru” Luciano Gonzaga, por toda sua dedicação, paciência e pelo seu enorme conhecimento transmitido.

A minha amiga Mônia, pessoa sem igual, um ser humano admirável. Por toda troca de conhecimento, conversas, conselhos, risadas e amizade! Agradeço muito por você ter cruzado na minha vida e agradeço esta conquista a você também, pois começamos juntas e vencemos essa batalha JUNTAS!

Ao Luciano Vitalli, por toda troca de conhecimento, ensinamentos, ajuda nas análises e pelas correções. Muito obrigada!

As minhas amigonas do coração: Jamila, Mariana, Joana, Akemi, Vanessa, Fran e Dai, por todas as risadas, cumplicidade, amizade, companheirismo, alegrias, enfim, por todos os momentos vividos intensamente.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para participação da mesma.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais retorna ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

VALESE, ANDRESSA CAMARGO. Desenvolvimento, otimização e validação de método rápido para análise simultânea de fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina em cereais por cromatografia eletrocínética micelar 2012. 182 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Os cereais são uma fonte importante fonte de proteína para o homem, sendo primordial em uma alimentação saudável e por este motivo a ANVISA, de acordo com Resolução (RDC 19/2010) passa a exigir das empresas fabricantes de alimentos, que forneçam a quantidade de fenilalanina, proteína e umidade de alimentos. Neste trabalho foi desenvolvido um método rápido para análise simultânea de fenilalanina (Phe), triptofano (Trp), histidina (His) e tirosina (Tyr) em amostras de cereais utilizando cromatografia eletrocínética micelar. O capítulo 2 versa sobre a otimização da composição do eletrólito de corrida e avaliação dos demais parâmetros instrumentais inerentes à técnica para determinação dos aminoácidos aromáticos, fazendo o uso de planejamentos fatoriais fracionário e completo. O eletrólito de corrida otimizado consistiu de 30 mmol L⁻¹ de H₃PO₄; 100 mmol L⁻¹ de SDS e 25% (v/v) de MeOH, com tempo de análise inferior a 2,5 minutos para a separação dos quatro aminoácidos. O terceiro capítulo se refere a validação intralaboratorial utilizando o protocolo de validação

EURACHEM. As curvas de calibração indicaram bom ajuste ao modelo linear, com níveis de concentração de 2,5-17,5; 10,1-40,4; 10,8-43,2 e 2,65-18,55 mg L⁻¹ para o Trp, Phe, His e Tyr, respectivamente. Foi verificado efeito de matriz para Tyr, e os limites de detecção encontrados foram de 0,5; 1,0; 2,5 e 0,25 mg L⁻¹, enquanto que e os limites de quantificação foram de 1,75; 3,0; 7,0 e 1,0 mg L⁻¹ para o Trp, Phe, His e Tyr, respectivamente. Os resultados de recuperação encontrados variaram de 80-110% para a Phe, Hist e Tyr o desvio padrão relativo (RSD) (%) para a precisão inter e intra-ensaio foram inferiores a 6,8% e 0,6% para a razão área do pico/padrão interno e tempo de migração, para todos os analitos em estudo. O método validado foi aplicado com sucesso em amostras comerciais de cereais sinalizando positivamente o uso da eletroforese capilar como técnica analítica confiável para determinação destes aminoácidos.

Palavras-chave: Cromatografia eletrocinética micelar. Aminoácidos. Validação intralaboratorial. Planejamento fatorial. Fenilcetonúria.

ABSTRACT

Cereals are an important source of protein for humans, according to Resolution (RDC 19/2010). ANVISA requires the manufacturers of foods to provide the amount of phenylalanine, protein and moisture in food. We have developed a rapid method for using micellar electrokinetic chromatography to simultaneously analyze phenylalanine (Phe), tryptophan (Trp), histidine (His) and tyrosine (Tyr) in cereal samples. Chapter 2 deals with the optimization of electrolyte composition of race and the assessment of other instrumental parameters inherent in the technique for determining aromatic amino acids using fractional factorial designs. The optimized background electrolyte consisted of 30 mmol L⁻¹ H₃PO₄, 100 mmol L⁻¹ SDS and 25 percent (v/v) MeOH, with running times less than 2.5 minutes. The third chapter refers to intralaboratory validation using validation protocol EURACHEM. The calibration curves showed a good fit to the linear model, with concentrations of 2.5 to 17.5, 10.1 to 40.4, 10.8 to 43.2 and from 2.65 to 18.55 mg L⁻¹ for Trp, Phe, His and Tyr, respectively. The matrix effect was observed for Tyr and LD were 0.5, 1.0, 2.5 and 0.25 mg L⁻¹. LQ were 1.75, 3.0, and 7.0 1.0 mg L⁻¹ to Trp, Phe, His and Tyr, respectively. The recovery results ranged from 80-110% for Phe, and Tyr His and the results RSD (%) for precision inter- and intra-day were less than 6.8% and 0.6% for the reason area peak/IS and migration time for all analytes under investigation. The validated method was successfully applied in commercial samples of cereals, signaling positively the use of capillary electrophoresis as a reliable analytical technique for determining these amino acids.

Keywords: Micellar electrokinetic chromatography. Amino acids. Intralaboratory validation. Factorial design. Phenylketonuria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1- Via de degradação da Phe em Tyr	37
Figura 1.2- Rotas alternativas para o catabolismo da Phe.....	38
Figura 2.1 -Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina (1) e triptofano (2).	72
Figura 2.2 - Estruturas químicas dos aminoácidos tirosina (1) e histidina (2).	74
Figura 2.3 - Curvas de mobilidade <i>versus</i> pH para os aminoácidos.....	82
Figura 2.4 - Eletroferograma dos padrões de His (1); Trp (2); Phe (3); Tyr (4). Eletrólito constituído por 20 mmol L ⁻¹ de ácido glutâmico, pH 2,1 ajustado com HCl; capilar, 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm de comprimento efetivo; temperatura 25 °C; tensão 30 kV, polaridade positiva; injeção hidrodinâmica 50 mbar durante 3 s; comprimento de onda 200 nm.	84
Figura 2.5 - Eletroferogramas correspondentes aos experimentos realizados no planejamento fatorial 3 ² com triplicata no ponto central. Ordem de migração: Trp; Phe; Hist e Tyr.	92
Figura 2.6 - Gráfico de superfície de resposta do planejamento fatorial 3 ²	96
Figura 2.7- Eletroferograma dos padrões de aminoácidos: (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr na concentração de 100 mg L ⁻¹ . Eletrólito de corrida: H ₃ PO ₄ 30 mmol L ⁻¹ , SDS 100 mmol L ⁻¹ , MeOH 25% (v/v); Condições experimentais: injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 s; tensão, 20 kV; polaridade negativa; temperatura, 25 °C; comprimento de onda, 200 nm.....	98

Figura 2.8 - Eletroferograma de uma amostra de cereal a base de milho, arroz e trigo hidrolisada. Para condições experimentais consultar Fig. 2.7	99
Figura 3.1 - Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em solventes, com indicação de cor preta dos respectivos <i>outliers</i>	143
Figura 3.2 – Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em solventes, com indicação de cor preta dos respectivos <i>outliers</i>	145
Figura 3.3 – Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em solução eletrolítica, com indicação de cor preta dos respectivos <i>outliers</i>	147
Figura 3.4 - Curvas de calibração dos aminoácidos em solvente e em solução eletrolítica	148
Figura 3.5 - Cromatograma de uma amostra (A) hidrolisada obtidos pelo método comparativo utilizando LC-MS/MS. O aminoácido Trp não foi detectado nessas condições.....	155
Figura 3.6 - Eletroferograma dos padrões de L-aminoácidos nas concentrações de 10 mg L ⁻¹ para Trp; 25,2 mg L ⁻¹ para Phe; 27 mg L ⁻¹ para His, 10,6 mg L ⁻¹ para Tyr. Condições de análise: eletrólito constituído por H ₃ PO ₄ 30 mmol L ⁻¹ , SDS 100 mmol L ⁻¹ , metanol 25%; capilar com 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm efetivo; tensão 20 kV; polaridade negativa; temperatura 25 °C; detecção em 200 nm. Padrão interno (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico	168
Figura 3.7 - Eletroferograma da amostra A hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico.	168
Figura 3.8 - Eletroferograma da amostra B hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico.	169

Figura 3.9 - Eletroferograma da amostra C hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico..... 169

Figura 3.10 - Eletroferograma da amostra D hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico..... 170

Figura 3.11 - Eletroferograma da amostra E hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico..... 170

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição dos cereais utilizados nos experimentos.....	124
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição centesimal de alguns cereais.....	44
Tabela 1.2 – Fatores utilizados para conversão de nitrogênio em proteína.....	45
Tabela 2.1 - Planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$	78
Tabela 2.2 - Planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central.	79
Tabela 2.3 - Experimentos envolvidos no planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$	88
Tabela 2.4 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central e respostas.	94
Tabela 3.1 - Parâmetros do espectrômetro de massas.	131
Tabela 3.2 - Concentrações das curvas de calibração.	134
Tabela 3.3 - Concentrações adicionadas de L-aminoácidos nas matrizes.	137
Tabela 3.4 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez pelo teste de Younden para o método eletroforético proposto	139
Tabela 3.5 – Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.	140
Tabela 3.6 – Comparações entre as inclinações e intersecções das curvas dos analitos no solvente e na solução eletrolítica.....	149
Tabela 3.7 – Médias de recuperação aparente para os quatro aminoácidos nas cinco amostras em diferentes níveis de concentração	151

Tabela 3.8 – Comparação do método proposto e LC-MS/MS.	153
Tabela 3.9 - Precisão intra e inter- ensaios para os aminoácidos.	158
Tabela 3.10 - Limites de detecção para os analitos.	160
Tabela 3.11 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para o triptofano.	162
Tabela 3.12 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a fenilalanina.	163
Tabela 3.13 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a histidina.	164
Tabela 3.14 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a tirosina.	165
Tabela 3.15 – Umidade relativa das amostras de cereais	167
Tabela 3.16 – Concentrações dos aminoácidos em base seca.	167
Tabela 3.17 – Valores de proteína nas amostras.	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ_{app} – mobilidade aparente

$\mu_{app\ i+j}$ – mobilidade aparente do composto adjacente

μ_{ef} – mobilidade eletroforética

μ_{eo} – mobilidade eletrosmótica

μm – micrômetro

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação Oficial de Químicos Analistas

b – tamanho da fração

BH₄ – tetraidrobiopterina (do inglês, *tetrahydrobiopterin*)

CE – eletroforese capilar (do inglês, *capillary electrophoresis*)

CMC – concentração micelar crítica

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CTAOH - hidróxido de cetiltrimetilamônio (do inglês, *cetyltrimethylammonium hydroxide*)

CV – coeficiente de variação

CZE – eletroforese capilar de zona (do inglês, *capillary zone electrophoresis*)

DAD – arranjo de diodos

DI – diâmetro interno

DP – desvio padrão

F – Estatística de Fisher-Snedecor

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

Glu – ácido glutâmico

H₃PO₄ – ácido fosfórico

His – histidina

HPA – hiperfenilalaninemia (do inglês, *hyperphenylalaninemia*)
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
 k – fatores
kV – quilovolts
L-aa – L-aminoácidos
LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (do inglês, *liquid chromatography–mass spectrometry*)
LD – limite de detecção
 L_{det} – distância da extremidade de injeção
Leu – leucina
Lis- lisina
LQ – limite de quantificação
 L_{tot} – comprimento total do capilar
 m/z – massa/carga
mbar – milibar
MECC – cromatografia capilar eletrocinética micelar (do inglês, *micellar electrokinetic capillary chromatography*)
MEKC – cromatografia eletrocinética micelar (do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*)
MeOH – metanol
MMOQ – método dos mínimos quadrados ordinários
 N – número de pratos
N.D. – não detectado
N.G.L. – número de graus de liberdade
NA – número de agregação

NAC – N-acetilcisteína

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – hidróxido de sódio (do inglês, *sodium hydroxide*)

NKT - Nitrogênio Kjeldahl Total

nm – nanômetro

OPA – o-ftaldeído

p – significância

PAH – fenilalanina hidroxilase (do inglês, *phenylalanine hydroxylase*)

PDC – ácido 2,6- piridina dicarboxílico

Phe – fenilalanina (do inglês, *phenylalanine*)

PKU – fenilcetonúria clássica (do inglês, *phenylketonuria*)

PPA – fenilpiruvato (do inglês, *phenylpyruvate*)

Pro – prolina

RDC – resolução

rpm – rotações por minuto

RSD – desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*)

s - estimativa do desvio padrão da inclinação da reta

S – inclinação da reta

SAC – serviço de atendimento ao consumidor

SDS – dodecilsulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*)

SE – solução estoque

Ser –serina

TBS – tetraborato de sódio

t_{final} – tempo final

Thre – treonina

t_{m} – tempo de migração

Trp –triptofano

Tyr – tirosina

UV-VIS – ultravioleta visível

V – diferença de potencial

v/v – volume/volume

Val – valina

X_i – concentração dos padrões

Y_i – razão das áreas analito/padrão interno

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução e Objetivos	30
1. INTRODUÇÃO	31
1.1 JUSTIFICATIVA.....	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 FENILCETONÚRIA.....	35
2.2 CEREAIS	41
2.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS	44
2.3.1 Método <i>Nitrogênio Kjeldahl Total</i>	44
2.3.2 Técnicas analíticas avançadas aplicadas à análise de aminoácidos	46
2.3.2.1 Cromatografia eletrocinética micelar	49
2.3.2.2 Eletroforese capilar na análise de aminoácidos	51
3. OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4. REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e otimização de método rápido para análise simultânea de fenilalanina, tirosina, histidina e	

triptofano por cromatografia eletrocinética micelar utilizando planejamento fatorial fracionário e completo	65
1. INTRODUÇÃO	65
1.1 AMINOÁCIDOS	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS	75
2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS.....	75
2.2 SOLUÇÕES.....	75
2.3 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	76
2.3.1 Eletroforese capilar	76
2.3.2 Condição experimental.....	76
2.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM PONTO CENTRAL DO TIPO $2v^{5-1}$	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 EXPERIMENTOS PARA TRIAGEM DAS VARIÁVEIS	81
3.2 CONSTRUÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO	86
3.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2 COM PONTO CENTRAL	91
3.5 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	94
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
5. REFERÊNCIAS.....	103

CAPÍTULO 3: Validação de método intralaboratorial para determinação de fenilalanina, triptofano, tirosina e histidina em cereais por cromatografia eletrocinética micelar	107
1. INTRODUÇÃO.....	107
1.1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	107
2. VALIDAÇÃO.....	111
2.1 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR	111
2.2 EFEITOS DE MATRIZ	114
2.3 SELETIVIDADE.....	115
2.4 EXATIDÃO	115
2.5 PRECISÃO	116
2.6 LIMITES DE DETECÇÃO	118
2.7 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO.....	119
2.8 ROBUSTEZ.....	119
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	123
3.1 AMOSTRAS.....	123
3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	125
3.3 SOLUÇÕES	126
3.4 HIDRÓLISE ÁCIDA	127
3.5 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	128
3.5.1 Eletroforese capilar.....	128

3.5.2 Condição experimental	128
3.5.3 Método comparativo usando LC-MS/MS	129
3.6 OUTROS EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E PROGRAMAS UTILIZADOS.....	131
3.7 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	132
3.8 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO KJELDAHL.....	132
3.9.1 Linearidade	133
3.9.2 Efeito de matriz	135
3.9.3 Seletividade	135
3.9.4 Precisão	136
3.9.5 Exatidão	136
3.9.6 Limites de detecção e quantificação	137
3.9.7 Robustez	138
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
4.1 LINEARIDADE	143
4.2 EFEITO DE MATRIZ	146
4.3 SELETIVIDADE.....	150
4.4 RECUPERAÇÃO E EXATIDÃO	150
4.5 PRECISÃO	157
4.6 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	160
4.7 ROBUSTEZ.....	161

4.8 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR	166
4.9 VALORES DE PROTEÍNA NAS AMOSTRAS.....	171
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	173
6. REFERÊNCIAS.....	175
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	181

CAPÍTULO 1: Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

A fenilcetonúria é uma desordem de herança autossômica recessiva, cujos pacientes portadores desta doença são incapazes de converter a fenilalanina (Phe, do inglês *phenylalanine*) em tirosina (Tyr, do inglês *tyrosine*), devido a uma deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase no fígado, que resulta em um acúmulo do nível de Phe e a produção de diversos metabólitos no sangue e nos tecidos, tais como o fenilacetato, fenilactato, fenilpiruvato, sendo estes excretados na urina (MARQUEZ et al., 1997).

A incapacidade de metabolizar a Phe acarreta em uma diminuição dos níveis de Tyr, levando a uma redução dos neurotransmissores formados por este aminoácido, como por exemplo, a dopamina, norepinefrina, epinefrina, conseqüentemente ocasiona deficiência mental. Outros problemas que também podem ser ocasionados é a redução de melanina no organismo, observando-se o clareamento da pigmentação da pele, cabelos e olhos (albinismo); hiperatividade; convulsões; comportamento agressivo ou tipo autista e retardo de crescimento (BURTIS; ASHWOOD, 1996).

Esta doença não apresenta cura até o momento, entretanto, quando diagnosticada precocemente, suas conseqüências podem ser evitadas ou minimizadas através do tratamento com uma alimentação especial, limitando a ingestão de Phe. Apenas é fornecido ao organismo a quantidade suficiente para a síntese e regeneração de proteínas.

Recomenda-se a continuidade deste tratamento de um paciente fenilcetonúrico por toda a vida (LANFER, 1996).

Em alimentos com reduzido teor protéico, a estimativa da concentração de Phe costuma ser realizada através de cálculo matemático, a partir da concentração de proteína no alimento e da porcentagem de Phe nesta proteína. A concentração de Phe varia entre 4 e 6%, possuindo uma relação direta com o teor de proteínas existente em um alimento, portanto, quanto maior o teor de proteínas presente, maior o teor de fenilalanina (MARQUEZ et al., 1997), não existindo nenhuma proteína isenta deste aminoácido. Todos os alimentos podem ser consumidos pelos portadores desta doença, desde que os níveis de fenilalanina não ultrapassem a tolerância individual. Dessa maneira, a precisão da estimativa da concentração de Phe depende, primeiramente, da exatidão da análise do conteúdo de proteínas nos alimentos.

Em virtude dos problemas que podem ser causados para os portadores de fenilcetonúria, este estudo justifica-se fundamentalmente pelo fato de que os cereais são uma fonte importante de proteína para o homem, sendo primordial em uma alimentação saudável e por este motivo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010) através da Resolução RDC 19/2010 determinou que, as informações sobre o teor de Phe, proteína e umidade presentes nos alimentos deverão ser disponibilizadas à população pelas empresas fabricantes de alimentos. A exigência é de que as empresas informem a quantidade de fenilalanina, proteína e umidade de alimentos com a finalidade de elaborar tabelas com estes conteúdos, assim como a disponibilização das informações por vias eletrônicas da empresa ou serviço de atendimento ao consumidor (SAC).

A medida é válida para alimentos que possuem teores de proteína entre 0,10 e 5,00%, como molhos de tomate, creme de leite, arroz, balas, bombons, entre outros. As informações encontram-se no portal da ANVISA (2010) e nos sites ou serviços de atendimento ao consumidor das empresas produtoras de alimentos. Entretanto, a maioria dos alimentos comercializados nacionalmente não possui informações sobre a composição em aminoácidos. O elevado custo da análise, somado à dificuldade em quantificar a fenilalanina em alimentos complexos, faz com que este aminoácido seja determinado em uma quantidade limitada de alimentos. Além disso, muitos alimentos com reduzido teor protéico, que são os principais alvos de interesse para os fenilcetonúricos, não são analisados com relação à sua composição em aminoácidos. Nos alimentos com teor protéico inferior a 3%, a fenilalanina participa com menos de 0,1% no alimento, trazendo dificuldades analíticas adicionais para a sua quantificação.

Neste contexto, o emprego da eletroforese capilar na determinação de fenilalanina em alimentos é de suma importância e mostra claramente seu potencial. Aspectos relevantes da técnica podem ser destacados tais como alta eficiência, alto poder de resolução, tempos de análise apreciavelmente curtos, total automatização, baixo custo operacional e baixa geração de resíduos. Buscando uma melhoria na qualidade dos resultados referentes à concentração deste aminoácido em alimentos com diferentes teores proteicos, este trabalho propõe o desenvolvimento, otimização e validação de um método rápido para determinação de Phe em cereais. Logo em função do elevado índice de fenilcetonúricos, a gravidade da doença; a carência de informações completas acerca da composição de aminoácidos; e a falta de exatidão

do método Kjeldahl, recomendado para análise de proteínas em alimentos, demonstra a necessidade pela busca de metodologias analíticas alternativas capazes de determinar de maneira confiável o teor de fenilalanina em amostras de alimentos contendo proteínas em sua composição, mesmo que em concentrações reduzidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FENILCETONÚRIA

A fenilcetonúria clássica (PKU, do inglês *phenylketonuria*) é uma doença hereditária do metabolismo, de transmissão autossômica recessiva, sendo a forma mais grave do grupo de doenças denominadas por hiperfenilalaninemias (HPA, do inglês *hyperphenylalaninemy*), nome genérico dado a diferentes distúrbios caracterizados por elevados níveis de fenilalanina (Phe, do inglês *phenylalanine*) no sangue causados pela hidroxilação deficiente deste aminoácido. As HPAs podem ser classificadas de acordo com níveis séricos de Phe, podendo ser divididas em (MIRA; MARQUEZ, 2000):

- a) Hiperfenilalaninemia Persistente persistente benigna: os níveis de Phe no sangue permanecem entre 2 e 6 mg dL⁻¹, sem prejuízos ao paciente e a atividade enzimática da fenilalanina hidroxilase (PHA, do inglês *phenylalanine hydroxylase*) é em torno de 1 a 5% do valor normal;
- b) Hiperfenilalaninemia transitória: é causada pela imaturidade temporária da PHA, caracterizada por níveis plasmáticos elevados de Phe logo após o nascimento. Estes níveis regredem em poucas semanas do pós-natal.
- c) Fenilcetonúria materna: anomalias em filhos de mães fenilcetonúricas, que apresentam níveis plasmáticos elevados de Phe durante a gestação. É caracterizado pelo

baixo peso ao nascimento, microcefalia, retardo mental e dismorfias faciais.

- d)** Fenilcetonúria clássica (PKU): condição causada pela deficiência na enzima PHA, na qual os níveis de Phe no sangue são maiores que 10 mg dL^{-1} , e a atividade enzimática é menor do que 1% do valor normal.

Mecanismos fisiopatológicos

A PKU foi a primeira hiperfenilalaninemia identificada e caracterizada como uma doença transmitida geneticamente, sendo uma disfunção do metabolismo de maior prevalência mundial, variando de 1:10.000 a 1:20.000 de nascidos vivos. (SCRIVER et al., 2001). No Brasil, esta doença é diagnosticada através do teste do pezinho pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) que foi implantado em 2001.

Esta doença apresenta herança autossômica recessiva, e é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase ou, em casos mais raros, a ausência de seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH_4). A PHA é a enzima responsável pela primeira reação na via de degradação da Phe, catalisando a sua hidroxilação em Tyr (Figura 1.1). A reação de hidroxilação envolve quantidades equimolares de fenilalanina, BH_4 e oxigênio. Esta reação é dependente de NADH ou NADPH (CARVALHO et al., 2006).

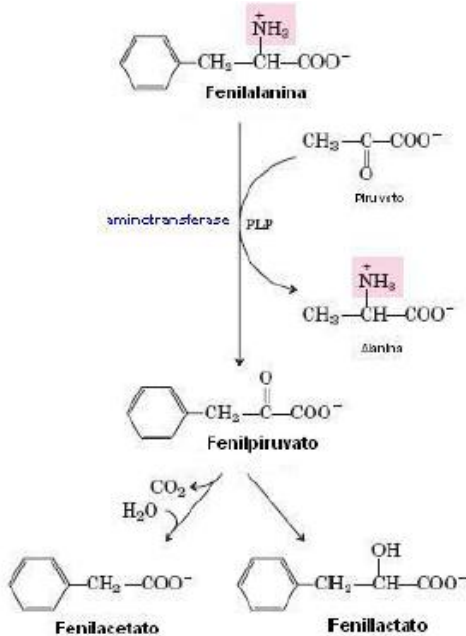
Figura 1. 1- Via de degradação da Phe em Tyr



Fonte: (LEHNINGER, 2006).

Uma deficiência nessa enzima pode levar ao acúmulo do substrato Phe a valores elevados, além de reações paralelas, como a transaminação da Phe com o piruvato que produz metabólitos secundários, tais como fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato (Figura 1.2). Esses compostos são metabólitos normais, mas que estão presentes em quantidades anormais nos pacientes fenilcetonúricos. E, principalmente, ocorre a diminuição da Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como a dopamina e a norepinefrina. (LEHNINGER, 2006).

Figura 1.2- - Rotas alternativas para o catabolismo da Phe



Fonte: (LEHNINGER, 2006).

Em indivíduos normais, 75% da Phe é transformada em Tyr, enquanto apenas 25% é incorporada às proteínas. Como a principal via catabólica da Phe está bloqueada em pacientes fenilcetonúricos, estes apresentam níveis sanguíneos deste aminoácido até vinte vezes maiores do que em pessoas saudáveis (STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2002). Outros metabólitos, como o fenilpiruvato (PPA) também se acumulam no sangue e em tecidos de pacientes fenilcetonúricos e são excretados em níveis elevados na urina destes pacientes.

Manifestações clínicas e diagnóstico

Pacientes com fenilcetonúria apresentam principalmente manifestações clínicas com alterações neurológicas, em que a maioria dos fenilcetonúricos não tratados apresenta retardo mental grave. Outros sintomas também são apresentados, tais como: atraso no desenvolvimento psicomotor, hiperatividade, convulsões, alterações cutâneas, distúrbios de pigmentação, dificuldades motoras, comportamento agressivo, hipotonicidade muscular, tremores, microcefalia, epilepsia, hipoplasia dentária, descalcificação de ossos longos e retardo do crescimento (FOIS; ROSEMBERG; GIBB, 1955; PIETZ et al., 1999).

Atualmente, a identificação da PKU é realizada através da triagem neonatal que é realizada alguns dias após o nascimento, em geral antes que o recém-nascido deixe o hospital. Uma gota de sangue é obtida por punção do calcanhar (teste do pezinho), seca em papel de filtro e enviada para avaliação dos níveis sangüíneos de fenilalanina (KOHLI et al., 2005). Antes, a identificação dessa doença era realizada através da análise da urina dos pacientes suspeitos pelo teste de cloreto férrico, hoje substituído pelo teste de inibição bacteriana em uma amostra de sangue coletada em papel filtro (SCRIVER et al., 2001). Os testes confirmatórios para esta doença são realizados através de métodos cromatográficos, enzimáticos e fluorimétricos e por espectrometria de massas (CLAGUE; THOMAS, 2002). O diagnóstico precoce é essencial para a qualidade de vida do paciente, visto que os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento, porém os primeiros danos neurológicos podem surgir antes do primeiro ano de vida caso não seja realizado o tratamento recomendado, e estes danos são irreversíveis.

Tratamento

O tratamento da PKU consiste em uma dieta com baixo teor de proteína, restrita em fenilalanina e enriquecida em ácidos graxos, na qual alimentos de origem animal são poucos utilizados. Esta dieta deve ser suplementada com uma formulação que seja rica em aminoácidos essenciais, livre de Phe, enriquecida com micronutrientes como vitaminas, minerais e elementos traços, que são necessários para o desenvolvimento do paciente. (SANTOS et al., 2006). A quantidade de Phe que pode ser ingerida depende muito da atividade da PAH e da tolerância de cada indivíduo. Este tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível e continuado durante toda sua vida, inclusive na fase adulta (SITTA et al., 2009).

Fenilcetonúria versus alimentação

A maioria dos alimentos nacionais não possui dados sobre a composição dos aminoácidos presentes, isto se deve ao elevado custo da análise e à dificuldade em quantificá-los por existirem em baixas concentrações, principalmente nos alimentos com teor proteico inferior a 3%, em que a fenilalanina participa com menos de 0,1% no alimento, trazendo dificuldades analíticas adicionais para a sua quantificação (LANFER MARQUEZ et al., 1997). Em virtude destas dificuldades, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC 19/2010 determinou que, as informações sobre o teor de fenilalanina, proteína e umidade presentes nos alimentos deverão ser disponibilizadas à população. A medida é válida para alimentos que possuem teores de proteína entre 0,10 e 5,00%, tais como molhos de

tomate, creme de leite, arroz, balas, bombons, entre outros. As informações encontram-se no portal da ANVISA e nos sites ou serviços de atendimento ao consumidor das empresas produtoras de alimentos. (BRASIL, 2010)

O elevado índice de fenilcetonúricos e a gravidade da doença, associada à falta de informações completas acerca da composição de aminoácidos, e a exatidão do método recomendado para análise de proteínas em alimentos, demonstram a necessidade pela busca de metodologias analíticas capazes de determinar o teor de fenilalanina em diversas amostras contendo proteínas em sua composição. O desenvolvimento de metodologias baseadas em técnicas de separação em microcolunas, como a eletroforese capilar traz uma significativa contribuição científica porque combina características desejáveis como alta seletividade de separação, eficiência, detectabilidade satisfatória e informação espectral pico a pico (quando utilizada detecção na região do UV-Vis com auxílio do DAD).

2.2 CEREAIS

Cereais são vegetais cultivados por seus frutos comestíveis, denominados cariopses. Pertencem à família das gramíneas, que abrange as gramas, relvas e capins. É a família mais importante das plantas para a economia humana, por se tratar do principal alimento cultivado no mundo; além de ser indispensável para a criação animal, fonte de sacarose e produção de etanol combustível. São produzidos no mundo em maiores quantidades do que os outros produtos e fazem parte da principal fonte calórica para o ser humano, sendo que em alguns países, predominam na dieta da população (KOBLOITZ, 2011).

Os principais cereais na alimentação humana e animal são: o trigo, milho, arroz, cevada, centeio, aveia, sorgo e triticale. E os pseudo-cereais - não pertencentes à família das gramíneas o trigo-sarraceno e a quinoa.

A definição para cereais de acordo com a legislação (Resolução CNNPA n°12, de 1978 da ANVISA) é a seguinte: “são sementes ou grãos comestíveis das gramíneas, tais como: trigo, arroz, centeio, aveia”. Os derivados dos cereais, de acordo com a mesma Resolução são classificados em: (BRASIL, 1978)

- i) cereais expandidos: obtidos por processos adequados, o qual rompe-se o endosperma e os grãos se inflam. Podem conter ou serem recobertos por substâncias comestíveis;
- ii) cereais laminados, cilindrados ou rolados: obtidos de grãos com ou sem tegumentos;
- iii) cereais em flocos: obtidos de cereais, livres do seu tegumento, cozidos, podendo ser adicionados de extrato de malte, mel, xaropes, sal e de outras substâncias comestíveis. São secos, laminados e tostados.
- iv) cereais pré-cozidos ou cereais instantâneos: obtidos de cereais, com ou sem tegumento, pré-cozidos e secos por processo adequado. Podem ser apresentados inteiros, laminados, em flocos ou sob forma de farinha.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que a produção nacional da safra de cereais, leguminosas e oleaginosas, alcançou a marca de 159 milhões de toneladas em 2011, com um aumento de 6,3% comparada à safra

anterior, que foi de 149,6 milhões de toneladas. O arroz, o milho e a soja, somados representam 90,6% da produção total de cereais leguminosas e oleaginosas. A região Sul, apresenta a maior produção destes grãos, sendo de 68,1 milhões de toneladas; o centro-oeste vem em segundo com 55,8 milhões de toneladas, o sudeste com 17,1 milhões de toneladas, o nordeste com 16,2 milhões de toneladas e por último a região norte, com uma produção de 4,3 milhões de toneladas. (IBGE, 2011)

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) prevê uma produção global de cereais em 2011/2012 de 2,302 bilhões de toneladas, tendo um déficit de oferta devido à redução das safras nos Estados Unidos e na Europa. Nesse contexto, o Brasil representa uma produção de 6,2% da produção mundial de grãos (FAO, 2011).

Os componentes majoritários de alguns cereais estão apresentados na Tabela 1.1, onde a composição está expressa em base úmida. Para aveia, arroz e cevada foi levado em consideração o grão inteiro, ou seja, com a presença da casca.

Tabela 1.1 – Composição centesimal de alguns cereais

Cereal	Umidade (%)	Carboi- dratos (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Fibras (%)
Arroz	11	65	8	2	9
Aveia	13	58	10	5	10
Centeio	11	71	12	2	2
Cevada	14	63	12	2	6
Milho	11	72	10	4	2
Sorgo	11	70	12	4	2
Trigo	11	69	13	2	3

Fonte: (KOBLOITZ, 2011)

2.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS

2.3.1 Método *Nitrogênio Kjeldahl Total*

O termo “Nitrogênio Kjeldahl Total” (NKT) refere-se à combinação de amônia e nitrogênio orgânico. O método de determinação de NKT foi desenvolvido em 1883 por Johan Kjeldahl, e tornou-se um método de referência para determinação de nitrogênio. O método consiste de uma completa digestão das amostras em ácido sulfúrico concentrado com catalisadores tais como sais de cobre e titânio em alta temperatura. Outros aditivos podem ser introduzidos durante a digestão de maneira a aumentar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico.

Durante a digestão todo o conteúdo de nitrogênio da amostra é convertido em sulfato de amônio e este produto é neutralizado com álcali e destilado comumente em uma solução de ácido bórico. O borato de amônio formado a partir da destilação é titulado com uma solução de ácido padronizada, e o resultado representa o conteúdo de nitrogênio bruto. Essa metodologia clássica é recomendada como oficial pela AOAC para determinação de proteínas em alimentos e um fator é utilizado para converter a percentagem de nitrogênio total em proteína bruta. A maioria das proteínas contém 16% de N, portanto o fator comumente utilizado é 6,25 ($100/16 = 6,25$). Alguns fatores de conversão para vários alimentos são apresentadas na Tabela 1.2. (NIELSEN, 1994)

Tabela 1.2 – Fatores utilizados para conversão de nitrogênio em proteína.

Alimento	% N presentes em proteínas	Fator
Ovo e carne	16,0	6,25
Leite	15,7	6,38
Trigo	18,0	5,70
Milho	16,0	6,25
Aveia	17,15	5,83
Soja	17,51	5,71

Fonte: (JONES, 1931; NIELSEN, 1994)

A principal desvantagem é a falta de exatidão do método, pois esse é capaz de determinar o conteúdo total de nitrogênio da amostra. Portanto resultados maiores podem ser observados pela presença de nitrogênio não proteico. Além disso, apresenta tempos de análise e consumo de reagentes (incluindo corrosivos) elevados.

Os cereais são uma fonte importante de proteína para o homem, porém outras fontes de proteínas também fazem parte da dieta, como leguminosas, sementes, carnes, entre outros, evidenciando a importância de conhecer corretamente a composição nutricional de cada componente, para que uma dieta seja planejada de forma correta e, principalmente, para pessoas que possuem algum tipo de intolerância ou restrição, conheçam as concentrações do que estão ingerindo.

Pacientes portadores de PKU precisam conhecer os valores da fenilalanina em cada cereal consumido, para que somado com outras fontes de proteínas ingeridas nas refeições, os resultados deste aminoácido não ultrapassem a tolerância individual e, também para que os pacientes possam fazer o cálculo para construção de sua dieta sem que a ingestão traga problemas.

2.3.2 Técnicas analíticas avançadas aplicadas à análise de aminoácidos

Várias técnicas analíticas podem ser utilizadas para determinar o teor de Phe nos alimentos, tais como analisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986; PIECYK et al.; 2007), pelo emprego de um sensor enzimático de membrana, "enzyme membrane sensor" (SHIMAMURA et al., 1999), cromatografia a líquido de alta eficiência

hidrofílica (CARREIRA et al., 2002), cromatografia a líquido e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CUMMINGS; BLANK, 2004; PIECYK et al., 2007; BJOERN; KERSTIN; NADINE, 2008; HELD; SCHWARZ; MALMQUIST, 2009; JOHNSON, 2011), espectrofotometria derivada segunda (O'HAYER; GREEN, 1978; RAGONE et al., 1984; GRANT; BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS; OJEDA; PAVON, 1988) e eletroforese capilar, sem (TAGLIARO; MORETTO; VALENTINI, 1994; SMYTH; SMYTH, 1996; CAO; HE; LI, 2002; ZHA; YANG; JIANG, 2006) e com hifenização com espectrômetro de massas (COLNAGHI; MORAES; CARRILHO, 2008; MASATAKA; NAOHIRO; HARUTO, 2010;).

Os métodos desenvolvidos por eletroforese capilar surgem como uma alternativa, pois apresentam tempos de análise apreciavelmente curtos, requerem uma menor demanda de amostras e reagentes, e, portanto uma menor geração de resíduos quando comparados aos métodos oficiais praticados atualmente. O desenvolvimento de novas metodologias que propiciem a redução de custos operacionais, bem como do número de instrumentos necessários para sua realização, possibilita a obtenção de resultados rápidos e precisos que podem ser cruciais tanto na otimização dos processos de obtenção de hidrolisados de proteínas quanto na elucidação das concentrações de Phe em alimentos consumidos por fenilcetonúricos.

A eletroforese é uma técnica instrumental de separação, baseada nas velocidades de migração de espécies diferentemente carregadas ou neutras com a aplicação de um campo elétrico (SKOOG, 2006). As espécies migram para o ânodo ou cátodo em função da sua carga

específica e a separação está baseada na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga/massa, e com fatores estruturais. Desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius no início da década de 30, a eletroforese foi usada para o estudo de proteínas no soro sanguíneo, rendendo ao químico o prêmio Nobel no ano de 1948 (TISELIUS, 1930).

Em seu formato capilar, a eletroforese foi desenvolvida nos anos 70. O desenvolvimento da técnica gerou interesse na indústria de biotecnologia, no que diz respeito ao seqüenciamento do DNA para o projeto Genoma Humano, além de ser uma técnica que se aplica para separações de cátions e ânions inorgânicos, aminoácidos, drogas, vitaminas, carboidratos, peptídeos, ácidos nucléicos, entre outros (LEWIS; ANASTOS; BARNETT, 2005). Atualmente, o termo eletroforese tem sido utilizado para nomear todos os tipos de técnicas de separação eletrodirigidas (SILVA et al., 2007).

A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) é realizada em tubos capilares (com dimensões de 15-100 μm de diâmetro interno). A CE oferece vantagens em relação a outros modos de eletroforese devido ao formato geométrico do capilar (a área superficial interna é grande comparada ao volume total) que dissipa o calor gerado pela passagem de corrente, controlando o efeito Joule de forma eficiente. Com isto é possível a aplicação de elevados valores de campo elétrico, resultando em separações de alta eficiência. Esta técnica oferece muitas vantagens, tais como o baixo consumo de amostras, reagentes e solventes, além da compatibilidade com vários detectores, entre eles o de absorção no UV-Vis e de espectrometria de massas (TAVARES, 1996), que fazem da CE uma técnica muito versátil.

Esta técnica agrupa um grande número de separações eletrodirigidas utilizando diferentes mecanismos de separação. O intervalo de aplicações da CE varia desde a análise de moléculas pequenas até moléculas de milhares de Daltons. Os modos podem ser agrupados em subclasses (SILVA et al., 2007): a) eletroforese capilar de zona; b) eletroforese capilar de afinidade; c) eletroforese capilar de peneiramento; d) eletroforese capilar em gel; e) focalização isoelétrica capilar; f) isotacoforese capilar; g) cromatografia eletrocínética; h) cromatografia eletrocínética micelar; i) cromatografia eletrocínética em microemulsão; e i) eletrocromatografia capilar. Neste trabalho será utilizada a cromatografia capilar eletrocínética micelar.

2.3.2.1 Cromatografia eletrocínética micelar

Um marco no campo de separações foi estabelecido por Terabe et al. (1984) com a introdução de uma versão modificada de eletroforese capilar, a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, do inglês *micellar electrokinetic chromatography*). Também conhecida por cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*) é um caso especial da cromatografia eletrocínética, na qual a fase dispersa do capilar é constituída por micelas (TAVARES, 1996).

A MEKC combina os mecanismos de separação da cromatografia com o movimento eletroforético e eletrosmótico de solutos e soluções. O desenvolvimento da MEKC representou um avanço para a eletroforese capilar, pois permitiu a separação de compostos neutros, ou seja, em MEKC, compostos com caráter

hidrofóbicos, como por exemplo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser separados, além da possibilidade da separação de compostos eletricamente neutros (KHALEDI, 1997; TAGLIARO; BORTOLOTTI, 2002).

Este modo de eletroforese capilar é baseado normalmente na adição de tensoativos ao eletrólito de corrida e caracteriza-se pela partição dos analitos entre uma fase micelar e o eletrólito.

Quando um tensoativo está presente na solução em uma concentração maior do que a concentração micelar crítica (CMC), o mesmo forma micelas, que são agregados de moléculas de tensoativos, e de acordo com o tensoativo empregado, a micela será constituída de um número diferente de monômeros, este numero é chamado de número de agregação (NA). As micelas formadas são normalmente de formato esférico, desta forma, os grupos hidrofílicos do tensoativo posicionam-se do lado externo da micela, enquanto que o hidrocarboneto hidrofóbico estará no centro da molécula, distante da fase aquosa.

Quando um composto insolúvel em água é adicionado a uma solução aquosa contendo micelas, o mesmo particiona com a porção hidrofóbica da micela. Caso um composto solúvel em água seja adicionado à solução, este não terá afinidade pela micela, pois não é solúvel na fase micelar. Um composto de solubilidade intermediária particionará entre a solução aquosa e as micelas, dependendo da hidrofobicidade do composto. As separações cromatográficas ocorrem devido à diferença de distribuição das moléculas da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel. As micelas são consideradas “fases pseudoestacionárias”, e esta técnica permite a separação simultânea de

compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Solutos ionizados também podem ser separados por MEKC, desde que possuam em sua estrutura grupos hidrofóbicos. Tais compostos migram devido à diferença na mobilidade eletroforética e também devido a interações com as micelas. MEKC em modo reverso é praticada na ausência de fluxo (LANDERS, 2008).

2.3.2.2 Eletroforese capilar na análise de aminoácidos

A carência de trabalhos publicados utilizando CE aplicada à determinação de aminoácidos em alimentos foi evidenciada durante o levantamento bibliográfico. Esta defasagem foi observada principalmente quando a procura era direcionada à análise de cereais e seus derivados, demonstrando a importância de novos estudos contemplando estas matrizes alimentícias.

Portanto, serão apresentados, alguns métodos reportados em literatura utilizando CE aplicada à análise de aminoácidos:

Um método com derivatização *on line* foi desenvolvido por Oguri; Yokoi e Motohase (1997), em que a separação e derivatização ocorreram simultaneamente, pois no eletrólito de corrida estavam presentes o tampão e o reagente derivatizante. A separação de 15 aminoácidos, incluindo a Phe ocorreu com eletrólito constituído de 15,4 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina, 2 mmol L⁻¹ de *o*-ftaldeído (OPA)/N-acetilcisteína (NAC) e 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato/borato, pH 10. O tempo de análise foi de 50 min. A precisão foi de 3 % e 1% (CV) para área das bandas e para o tempo de migração, respectivamente. A linearidade foi de 0,025 a 1,25 mmol L⁻¹. O LOD para a Phe foi de 0,5

mmol L⁻¹. Para determinar a precisão deste método, os autores compararam os resultados encontrados com HPLC, confirmando a aplicabilidade e praticidade do uso da CE, além do método ser capaz de determinar enantiômeros de aminoácidos. Este método foi aplicado com sucesso em amostras de proteína de soja hidrolisada.

Um método utilizando eletroforese capilar para análise de proteínas e 17 aminoácidos, incluindo fenilalanina, foi publicado por Chou et al. (1998). O eletrólito de corrida utilizado foi constituído por 0,1 mol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio e 0,02 mol L⁻¹ de tetraborato de sódio em dihidrogenofosfato de sódio, pH 9,0. Os aminoácidos foram separados em 32 minutos e aplicados na diferenciação de barbatanas de tubarão artificiais e naturais.

Outra proposta para determinação de aminoácidos livres utilizando CE-UV foi publicada por Klampfl et al. (1998). A separação foi alcançada em 35 minutos utilizando eletrólito de corrida com 10 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, 30 mmol L⁻¹ de ácido octanosulfônico, pH 2.36. Este método mostrou-se eficiente na análise de bebidas.

Um método para análise simultânea de ânions inorgânicos, ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos foi proposto por Soga e Ross (1999). O método de separação foi desenvolvido utilizando-se o modo de detecção indireta com ácido 2,6- piridina dicarboxílico. O eletrólito de corrida otimizado foi composto por 20 mmol L⁻¹ de PDC e 0,5 mmol L⁻¹ de hidróxido de cetiltrimetilamônio (CTAOH), em pH 12,1 ajustado com NaOH. O método de separação foi aplicado em amostras de molho de soja, bebidas e em abacaxi, com tempo total de análise de 40 minutos.

Páez; Rada e Hernández (2000) utilizaram MECK com detecção por fluorescência para separação e quantificação de Phe, Tyr, Thre e Val em plasma de pacientes fenilcetonúricos. Portadores desta doença apresentaram uma concentração de Phe maior, e menor de Tyr em relação à normalidade. A relação de Phe/Tyr apresentou-se 21 vezes maior com uma diminuição das concentrações de Val e Thre. O eletrólito de corrida contendo 34 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 120 mmol L⁻¹ de SDS e 1% de metanol em 9 min mostraram-se eficiente.

Segura-Carretero et al. (2004) desenvolveram um método por CZE para determinação simultânea de alcoóis, amins, aminoácidos, flavonóides e purina em sete amostras de cervejas internacionais adquiridas no comércio local. A melhor separação para os analitos foi alcançada com o eletrólito constituído de 70 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 10,25 em 35 mim.

Jiang et al. (2009) propuseram a determinação direta de aminoácidos sem derivatização, utilizando CE-UV. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de sete aminoácidos em saliva humana e amostras de chá verde. A separação ocorreu através de interações entre íons Cu e os aminoácidos avaliados (Lis, His, Ser, Leu, Phe, Glu e Pro), alcançando alta detectabilidade. Os pesquisadores também utilizaram estratégias de pré-concentração *on line* (*stacking*) para incrementar a detectabilidade do método. O tempo de análise alcançado para os sete aminoácidos foi de 24 minutos.

As metodologias por apresentarem tempo de análise longos e a carência de métodos validados analiticamente aliados a potencialidade

da CE para análise destes aminoácidos, motivaram a realização deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo propõe o desenvolvimento de um método rápido para determinação de fenilalanina e outros aminoácidos com características estruturais semelhantes, triptofano, histidina e tirosina, em amostras de cereais utilizando cromatografia eletrocínética micelar. Este estudo contemplará a otimização do método de análise utilizando planejamento de experimentos; e a validação intralaboratorial da metodologia analítica proposta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização da composição do eletrólito de corrida e avaliação dos demais parâmetros instrumentais inerentes à técnica para análise simultânea de fenilalanina, triptofano, tirosina e histidina em cereais utilizando planejamento fatorial fracionário e completo;
- Validação intralaboratorial da metodologia proposta de acordo com protocolo de validação EURACHEM, contemplando a avaliação de parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção, limites de quantificação e robustez;

- Utilização de ferramentas estatísticas para avaliação dos parâmetros estudados para validação intralaboratorial;
- Avaliação da exatidão do método proposto através de estudo comparativo utilizando LC-MS/MS para análise das amostras;
- Aplicação da metodologia devidamente validada na determinação de fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina em amostras de cereais.
- Determinação do teor de proteína pelo método Kjeldahl para comparação com o valor nominal informado nos rótulos dos cereais analisados;
- Determinação de fenilalanina (% , m/m) em relação ao teor total de proteína.

4. REFERÊNCIAS

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** Resolução CNNP nº12, de 24/07/1978.

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** Disponível. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 06 de novembro de 2010.

BJOERN, T.; KERSTIN, F.; NADINE, S. Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 2663-2672, 2008.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.T. - **Fundamentos de química clínica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 836.

CAO, C.X.; HE, Y.Z.; LI, M. Improving separation efficiency of capillary zone electrophoresis of tryptophan and phenylalanine with the transient moving chemical reaction boundary method. **Journal of Chromatography A**, v. 952, n. 1-2, p. 39-46, 2002.

CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 229-32, 2002.

CARVALHO, M.R.S.; SANTOS, L.L.; MAGALHÃES, M.C.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B. The time has come: a new scene for PKU treatment. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n.1, p. 33-

44, 2006.

CHOU, S.; SU, S.; SHIAU, H.; HWANG, D.; YU, P.; LEE, S. Protein and amino acid profiles in natural and artificial shark fins using capillary electrophoresis. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 1-3, 1998.

CLAGUE, A; THOMAS, A. Neonatal biochemical screening for disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 315, p. 99-110, 2002.

COLNAGHI, S.A.V; MORAES, E.P.; CARRILHO, E. Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures. **Electrophoresis**, v. 29, n. 10, p. 2051-2058, 2008.

CUMMINGS, C.G.; BLANK, J.G. Quantitative analysis of amino acids using LCMS. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 227, n. 1, p. 605-605, 2004.

FOIS, A.; ROSEMBERG, C.; GIBB, F.A. The electroencephalogram in phenylpyruvic oligophrenia. **Electroencephalography & Clinical Neurophysiology**, v. 7, p. 568-569, 1955.

GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. **Journal of Chromatography A**, v. 347, p. 219-235, 1985.

GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSK, J.R.M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. **Clinical Science**, v. 71, p. 65-69, 1986.

HELD, P.K.; SCHWARZ, E.; MALMQUIST, M. Evaluation of a LC-

MS/MA method for quantitative analysis of amino acids. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 98, n. 1-2, p. 24-24, 2009.

JIANG, X.; XIA, Z.; WEI, W.; GOU, Q. Direct UV detection of underivatized amino acids using capillary electrophoresis with online sweeping enrichment. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1927-1933, 2009.

JOHNSON, D.W. Free amino acid quantification by LC-MS/MS using derivatization generated isotope-labelled. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 17-18, p. 1345-1352, 2011.

KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. **An International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 907-913, 1985.

KHALEDI, M. G. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 780, n. 1-2, p. 3-40, sep. 1997.

KLAMPF, C.W. Analysis of Organic Acids and Inorganic Anions in Different Types of Beer Using Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 987-990, 1999.

KLAMPF, C.W.; BUCHBERGER, W.; TURNER, M.; FRITZ, J.S. Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 804, p. 349-355, 1998.

KOBLITZ, M.G.B. **Matérias-primas alimentícias: composição e**

controle de qualidade. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 45-119.

KOHLI, S.; SAXENA, R.; THOMAS, E.; RAO, P.; VERMA, I.C. Prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Indian Journal of Medical Research**, v. 122, p. 400-403, 2005.

LANFER MARQUEZ, U. M.; NISHI, L. E.; BARROS, R.M.C.; FILISETTI COZZI, T. M.C.C.; PENTEADO, M.V.C. Estudo da composição química de flocos de cereais com ênfase nos teores de fenilalanina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 314-319, 1997.

LANFER, M.U.M. Fenilcetonúria: Aspectos bioquímicos, nutricionais e importância da alimentação. *Cadernos de Nutrição*. São Paulo, 1996. 11: 51-68.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1232p.

LEWIS, S.W.; ANASTOS, N.; BARNETT, N.W. Capillary electrophoresis for forensic drug. Analysis: a review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.

LEWIS, S.W.; SWANN, L.M.; FORBES, S.L. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. **Talanta**, v. 81, p. 1697-1702, 2010.

MARQUEZ, L. M. U.; NISHI, L. E.; BARROS, C. M. R.; COZZI, F. C. C. M. T.; PENTEADO, C. V. M. Estudo da composição química de flocos de cereais com ênfase nos teores de fenilalanina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 17-3, 1997.

MASATAKA, W.; NAOHIRO, A.; HARUTO, S. Analysis of amino acids and carboxylic acids by capillary electrophoresis-mass spectrometry using an acidic electrolyte and uncoated fused-silica. **Analytical Chemistry**, v. 82, n.24, p. 9967-9976, 2010.

MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n.1, p. 86-96, 2000.

O'HAVER, T.C.; GREEN, G.L. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 312-318, 1978.

PAÉZ, X.; RADA, P.; HERNÁNDEZ, L. Neutral amino acids monitoring in phenylketonuric plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 739, p. 247-254, 2000.

PIECYK, M.; SRAMA, A.; BZDUCHA, A.; OBIEDZINSKI, M. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2007.

PIETZ, J.; KREIS, R.; RUPP, A.; MAYATEPEK, E.; RATING, D.; BOESCH, C.; BREMER, H. J. Large neural amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p.1169-1178, 1999.

RAGONE, R.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; SERVILLO, L.; IRACE, G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. **Biochemistry**, v. 23, p. 1871-1875, 1984.

ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. **Talanta**, v. 35, p. 753-761, 1988.

SANTOS, L.L.; MAGALHÃES, M.C.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; CARVALHO, M.R.S. The time has come: a new scene for PKU treatment. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 33-44, 2006.

SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. Hyperphenylalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Basis of inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1667-1724.

SEGURA-CARRETERO, A.; CORTACERO-RAMIREZ, S.; CRUCES-BLANCO, C.; ROMERO-ROMERO, M.L.; FERNANDÉZ-GUTIÉRREZ, A. Simultaneous determination of multiple constituents in real beer samples of different origins by capillary zone electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, p. 831-837, 2004.

SHIMAMURA, S.; TAMURAY.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N. **Peptide mixture and products thereof**. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 1997 Apr 14; 1999 Sep 14.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.740-744, 2007.

SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; DEON, M.; BARDEN, A.T.; VARGAS, P.R.; SOUZA, C.F.; NETTO, C.; WAJNER, M.; BIANCINI,

G.; VARGAS, C.R. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 2, p. 243–247, 2009.

SKOOG, D.A. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira, 2006, 999p.

SMITH, F.E.; ARSENAULT, E.A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p. 1207-1268, 1996.

SOGA, T.; ROSS, G.A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 231–239, 1999.

STRYER, L.; BERG, J.M; TYMOCZKO, J.L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: Freeman and Company, 2002.

TAGLIARO, F., BORTOLOTTI, F. Review of: clinical and forensic applications of capillary electrophoresis, first edition. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n. 3, p. 713-728, may. 2002.

TAGLIARO, F.; MORETTO, S.; VALENTINI, R. Capillary zone electrophoresis determination of phenylalanine in serum - a rapid, inexpensive and simple method for the diagnosis of phenylketonuria. **Electrophoresis**, v. 15, n. 1, p. 94-97, 1994.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar./abr. 1996. Divulgação.

TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA K., TSUCIYA, A., ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular

capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111-113, sep. 1984.

TISELIUS, A. **The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins**. Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, 1930.

ZHA, Y.; YANG, X.B.; JIANG, R. Analysis of optical purity and impurity of synthetic D-phenylalanine products using sulfated beta-cyclodextrin as chiral selector by reversed-polarity capillary electrophoresis. **Chirality**, v. 18, n. 2, p. 84-90, 2006.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e otimização de método rápido para análise simultânea de fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano por cromatografia eletrocínética micelar utilizando planejamento fatorial fracionário e completo

1. INTRODUÇÃO

Comumente, estudos que objetivam a otimização de variáveis experimentais são realizados através de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez, o que, de maneira geral, impede o estabelecimento de ótimos verdadeiros, em razão da frequência com que as variáveis se apresentam altamente correlacionadas. Ou seja, um dos problemas mais comum para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável existente (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2010).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX; HUNTER e HUNTER, 2005). Embora essa metodologia tenha sido proposta por Box na década de 50 (BOX; HUNTER e HUNTER, 1978), somente nos últimos anos ela tem sido mais intensamente utilizada.

No planejamento de qualquer experimento, uma etapa decisiva é a escolha dos fatores e respostas que devemos considerar. Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de

controlar, enquanto as respostas são as variáveis de saída do sistema, nas quais estamos interessados, e que serão – ou não – afetadas por modificações provocadas nos fatores. Podendo ser qualitativas ou quantitativas. Dependendo do problema, podemos ter várias respostas de interesse, que talvez precisem ser consideradas simultaneamente.

Após a identificação de todos os fatores e respostas a serem consideradas, a próxima etapa é definir, com o máximo de clareza, o objetivo que pretendemos alcançar com os experimentos, para que então o planejamento mais apropriado possa ser escolhido. O planejamento dos experimentos, isto é, a especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas, vai depender do objetivo particular que se quer atingir. Objetivos diferentes precisarão de planejamentos diferentes.

Em investigações preliminares, planejamentos fatoriais de dois níveis são muito úteis, principalmente se o objetivo é descobrir se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta. São planejamentos relativamente simples quanto a execução, e a seguir podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado, quando se quer conhecer melhor a relação entre a resposta e os fatores importantes (MONTGOMERY, 1997).

Por outro lado, se um número de fatores relativamente grande for considerado, é possível que alguns deles não tenham influência significativa sobre a resposta para a faixa de nível considerada. Nesse caso, um planejamento completo seria um desperdício: o melhor seria fazer primeiro uma triagem, para decidir então quais são os fatores que merecem um estudo mais aprofundado. Para isso, um planejamento

fatorial incompleto como, por exemplo, um fatorial fracionário seria o procedimento de escolha.

A utilização de planejamentos experimentais demonstra diversas vantagens, dentre essas destacam-se: i) seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios; ii) possibilidade de estudo simultâneo das diversas variáveis envolvidas em processos; iii) a redução do número de ensaios, sem prejuízo da qualidade da informação; iv) elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos; v) verificação e quantificação de efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; entre outras.

Para executar um planejamento fatorial, começamos especificando os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores (ou as classes, nos casos qualitativos) que serão utilizados durante os experimentos. Para um planejamento fatorial completo, experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores deverão ser realizados.

Para k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo experimentador, um planejamento completo de dois níveis exige a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^k . Esta representação mostra que, se em um planejamento forem escolhidos 2 diferentes níveis para 3 fatores (2^3), o número de experimentos diferentes a serem realizados será 8.

Apesar dos planejamentos fatoriais do tipo 2^k serem mais comuns, e que com um número reduzido de níveis é praticamente impossível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis (>4), estes ainda se mostram vantajosos, pois permitem

verificar tendências importantes para a realização de investigações posteriores. Neste tipo de planejamento fatorial, no qual os níveis são comumente codificados com os sinais (+) e (-), a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Estes sinais também permitem esquematizar estas variáveis na forma de matrizes de planejamento, assim como determinar, por meio de cálculos, a influência das mesmas e das suas interações no sistema (MONTGOMERY, 1997).

Além do exposto, cabe ressaltar que em um planejamento fatorial, as réplicas ou repetições de experimentos são de fundamental importância e servem para a estimativa do erro experimental, e a partir daí avaliar a significância estatística dos efeitos. Para isso, é preciso que a replicação seja uma repetição autêntica, isto é, a realização, por mais de uma vez, de todas as etapas do ensaio. Este ponto é muito importante, pois caso as repetições aconteçam de forma imprópria, sem incluir a variabilidade total do processo, os erros vão parecer menores que na realidade são, e talvez o analista reconheça efeitos significativos onde esses na realidade não existem (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, isto é, para impedir que desvios atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, devemos realizar os ensaios em ordem aleatória. A aleatorização é outro princípio experimental muito importante que ajuda a impedir que fatores indesejáveis, dos quais não estamos cientes, interfiram nos efeitos que estão sendo investigados.

O número de ensaios necessários para a realização de um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com k , o número de fatores investigados. Com sete fatores, por exemplo, um planejamento completo exigiria nada menos do que $2^7 = 128$ ensaios. Em um desses casos, a informação desejada muitas vezes pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor.

Em situações nas quais o pesquisador pode aceitar como desprezíveis os efeitos das interações de segunda ordem e superiores, então informações interessantes sobre os efeitos principais e sobre as interações de primeira ordem, podem ser obtidas a partir de uma fração do número de ensaios do planejamento completo (BOX; HUNTER e HUNTER, 1978).

Por outro lado, em muitas situações não é conhecida, *a priori*, a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta. Para não haver o risco de excluir fatores que podem vir a serem importantes nesse estágio, o maior número possível de variáveis devem ser estudadas.

É importante ressaltar que delineamentos fatoriais fracionários tem importância vital nos experimentos que antecedem ao experimento final, como no caso da seleção de fatores e de seus níveis (tipo *screening*). No entanto, o delineamento final deve ser realizado com base num delineamento completo.

O planejamento experimental vem sendo utilizado com o objetivo de aprimorar metodologias analíticas e tem possibilitado, por exemplo, melhorar o desempenho de separações utilizando eletroforese capilar (EHLEN; ALBERS e BREYER, 2005; CAPELLA-PEIRO;

BOSSI e ESTEVE-ROMERO, 2006; POLONINI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2011) Em análises utilizando HPLC, uma maior resolução dos picos cromatográficos e um menor consumo de reagentes e solventes podem ser alcançados sem prejuízo na qualidade dos resultados. Ainda reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida a partir dos resultados, o que se reflete numa sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final das análises (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Ballusa et al. (2011) otimizaram e validaram um método, utilizando eletroforese capilar de zona, para separação simultânea e quantificação de 13 compostos fenólicos em amostras de azeite extravirgem. Um planejamento fatorial composto central, associado à análise de superfície de resposta foi utilizado. Este procedimento multivariado foi eficiente para encontrar a condição de separação ótima a partir da avaliação de cinco respostas envolvendo resoluções dos picos adjacentes e tempo de análise. Os mesmos autores (MEINHARTA et al., 2011) utilizaram planejamento estatístico multivariado e a função de desejabilidade de Derringer-Suich aplicados à determinação de carboidratos em diferentes matrizes alimentícias. Foi utilizada cromatografia eletrocinética micelar com tensoativo aniônico. Esta estratégia tem sido utilizada com sucesso para analisar compostos de difícil separação, mas ainda não havia sido explorada na análise de carboidratos. Os efeitos do pH dos eletrólitos de corrida e a concentração do tensoativo aniônico foram investigados a partir de um planejamento composto central que exigiu 17 experimentos. A otimização simultânea das respostas para a separação de seis conjuntos de carboidratos foi realizada utilizando modelos empíricos para a

previsão das condições de melhor resolução em seis matrizes. Os resultados indicaram uma boa separação dos compostos nas amostras, demonstrando o sucesso da aplicação deste tipo de planejamento.

A separação de seis isoflavonas de soja foi estudada a partir de um planejamento fatorial 3^2 por TAVARES et al. (2006) Foram avaliados os componentes do eletrólito de corrida nos seguintes níveis: metanol (MeOH; 0-10%) e dodecilsulfato de sódio (SDS; 20-70 mmol L⁻¹); o tampão tetraborato de sódio foi mantido constante 10 mmol L⁻¹. Nove experimentos foram efetuados e a mobilidade aparente de cada isoflavona foi calculada como uma função da composição de eletrólito. Uma função resposta foi formulada, levando em consideração a produtória das diferenças de mobilidade, a mobilidade do primeiro e do último pico, e a condutividade do eletrólito. A análise da superfície de resposta indicou uma composição de eletrólito de corrida ótimo constituído por 10 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (pH 9,3), 40 mmol L⁻¹ de SDS e 1% de MeOH. A separação em linha de base foi alcançada em menos de 7,5 minutos.

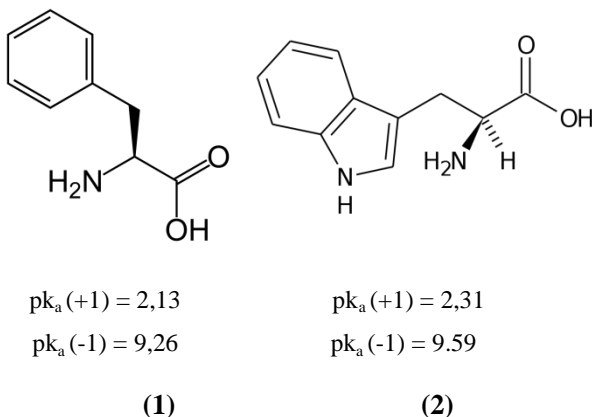
1.1 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são classificados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais, ou seja, se são apolares (apresentam distribuição homogênea de elétrons) ou polares (apresentam distribuição desigual de elétrons) (CHAMPE; HARVEY e FERRIER, 2009).

Os aminoácidos fenilalanina e triptofano, além de possuírem absorvidade na região do UV, são classificados como aminoácidos

com cadeias laterais apolares, ou seja, são incapazes de receber ou doar prótons, de participar em ligações iônicas ou formar ligações de hidrogênio (Figuras 2.1). As cadeias laterais desses aminoácidos podem ser vistas como “oleosas”, ou semelhantes a lipídeos, pela propriedade de promover interações hidrofóbicas.

Figura 2. 1 - Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina (1) e triptofano (2).

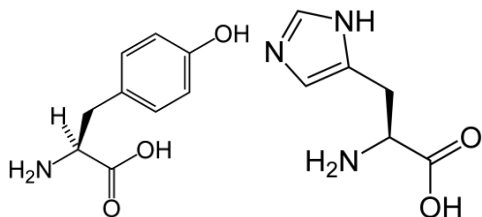


Fonte: (LEHNINGER, 2006).

Os teores de fenilalanina em proteínas alimentares variam entre 4 e 6%, não existindo nenhuma proteína natural isenta deste aminoácido. Portanto, quanto maior o teor de proteína em um alimento, maior será o teor de fenilalanina. Cabe salientar que, a princípio, todos os alimentos podem ser consumidos por fenilcetonúricos, desde que o seu teor em fenilalanina não ultrapasse a tolerância individual. Na prática, soma-se a quantidade de fenilalanina contida em todos os

ingredientes utilizados no preparo das refeições e adapta-se à quantidade deste ou daquele alimento à tolerância do paciente ao aminoácido. O que, para os portadores desta doença é de extrema importância conhecer a quantidade que está ingerindo desse aminoácido para evitar problemas mais graves.

Ainda que o objetivo principal desse estudo fosse desenvolver um método rápido para determinação de fenilalanina, outros aminoácidos foram utilizados durante a otimização das condições experimentais, uma vez que, além do triptofano, a tirosina e a histidina também absorvem na região do UV. A tirosina e a histidina (Fig. 2.2) são classificadas como aminoácidos de cadeias laterais polares desprovidas de cargas e de cadeias laterais básicas, respectivamente. O primeiro pertence ao grupo de aminoácidos que apresentam carga igual a zero, em pH neutro. Embora a cadeia lateral da tirosina possa perder um próton em pH alcalino, ainda possui característica de conter um grupo hidroxila polar que pode participar da formação de pontes de hidrogênio. O segundo aminoácido pertence ao grupo de aceptores de prótons, embora possua característica de ser fracamente alcalino, o aminoácido livre não apresenta carga elétrica em pH fisiológico (CHAMPE; HARVEY e FERRIER, 2009; RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Figura 2.2- Estruturas químicas dos aminoácidos tirosina (1) e histidina (2).

$$pK_a(+1) = 2,18$$

$$pK_a(-1) = 9,1$$

$$pK_a(-2) = 10,18$$

(1)

$$pK_a(+2) = 2,01$$

$$pK_a(+1) = 6,04$$

$$pK_a(-1) = 9,33$$

(2)

Fonte: (LEHNINGER, 2006).

Neste estudo foi realizado um planejamento fatorial fracionário Resolução V com triplicata no ponto central e planejamento fatorial completo 3^2 com triplicata no ponto central. O planejamento fracionário foi executado a fim de identificar a partir dos efeitos principais, indicações das variáveis que deveriam ser incluídas no delineamento seguinte e ainda, definição das novas faixas que deveriam ser estudadas para cada variável. O objetivo foi desenvolver um método rápido para análise simultânea de fenilalanina, histidina, tirosina e triptofano a ser aplicado em amostras de cereais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Padrões dos L-aminoácidos Phe (>99%), Tyr (98%), His (>99%), e Trp (>99%) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.) foram utilizados como padrões analíticos de alto grau de pureza, durante as análises, pois, apesar deste estudo contemplar a determinação de fenilalanina, os outros aminoácidos supracitados poderiam causar interferência no método desenvolvido utilizando CE, e, portanto foi de grande importância para avaliação da seletividade e especificidade da metodologia proposta.

Outros reagentes utilizados durante os experimentos: NaOH PA (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); H₃PO₄ (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ácido 3,5 dinitrobenzóico e metanol (99,9%) (Sigma Aldrich, St. Louis, CO, E.U.A.); e dodecilsulfato de sódio (SDS) adquirido da Bio Agency Laboratórios (São Paulo, SP, Brasil).

2.2 SOLUÇÕES

As soluções estoque de Phe, Tyr, His e Trp foram preparadas isoladamente pela dissolução de 10 ± 1 mg do padrão em 10 mL de água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Nas soluções de histidina e tirosina foi necessário acidificar o meio para um aumento da solubilidade desses compostos. Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, até o momento do ensaio, e preparadas de acordo com a necessidade de cada procedimento experimental.

Padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico foi utilizado como padrão interno. A concentração da solução estoque foi de 1000 mg L^{-1} , preparada em metanol. Nas soluções padrões a serem analisadas a concentração final e constante do padrão interno foi de 25 mg L^{-1} .

O preparo dos eletrólitos de corridas utilizados durante os planejamentos, e para a condição definitiva de separação, foram preparados a partir de soluções estoque de H_3PO_4 100 mmol L^{-1} e SDS 400 mmol L^{-1} .

Solução de NaOH 1 mol L^{-1} foi utilizada para o condicionamento inicial do capilar.

2.3 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

2.3.1 Eletroforese capilar

Os procedimentos analíticos foram realizados em equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo Agilent 7100 (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array*) e sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar. O *software* (HP ChemStation, rev A.06.01) foi utilizado para tratamento e aquisição de dados.

2.3.2 Condição experimental

Os capilares utilizados são de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poliimida, com $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, $48,5 \text{ cm}$ de comprimento

total e 8,5 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de aproximadamente 940 mbar, foram realizadas diariamente com 15 min de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, 15 min de água desionizada e 15 min de eletrólito de corrida. No intervalo entre corridas, o capilar foi recondicionado com lavagens de 60 segundos com eletrólito de corrida e, no término das análises, 10 min de hidróxido de sódio e 10 min água foram suficientes para a limpeza do capilar, armazenado com as extremidades imersas em água desionizada.

A injeção das soluções padrão foi realizada pelo *outlet* (extremidade do capilar mais próxima do detector), injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar por 3 segundos. O monitoramento dos sinais e do espectro no UV foi efetuado em 200 nm. A aquisição e tratamento dos eletroferogramas foram realizados pelo *software* HP Chemstation.

A constituição final do eletrólito de corrida foi de 30 mmol L^{-1} de H_3PO_4 , 100 mmol L^{-1} de SDS, 25% de metanol, e a separação dos analitos transcorreu com tensão aplicada de 20 kV, com polaridade negativa, temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em tempo inferior a 2,5 minutos.

2.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM PONTO CENTRAL DO TIPO $2\sqrt{5}^{-1}$

As variáveis investigadas foram: tensão aplicada; porcentagem de metanol adicionado ao eletrólito de corrida; concentração de H_3PO_4 (mmol L^{-1}); concentração de SDS (mmol L^{-1}); e temperatura do cartucho do capilar ($^\circ\text{C}$). Essas variáveis e seus correspondentes níveis estão

representados na Tabela 2.1. Todas as variáveis foram avaliadas em dois níveis, sendo um baixo (representado por -1) e um alto (+1). O experimento do ponto central (0) foi realizado em triplicata, possibilitando com isso avaliar o erro puro, ou seja, o erro padrão calculado através dos pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Tabela 2.1 - Planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$.

Variáveis	Fator	Nível		
		-1	0	+1
1	Tensão, <i>kV</i>	20	25	30
2	[Metanol], %	10	20	30
3	[H ₃ PO ₄], <i>mmol L⁻¹</i>	30	35	40
4	[SDS], <i>mmol L⁻¹</i>	60	80	100
5	Temperatura, °C	20	22,5	25

Fonte: o próprio autor.

Após a indicação das variáveis que influenciaram na separação dos aminoácidos, a partir das respostas geradas com o planejamento fatorial fracionário, foi construído um novo delineamento utilizando planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central. As variáveis investigadas no segundo planejamento foram: porcentagem de metanol e concentração de SDS (mmol L^{-1}), enquanto foram mantidos fixos: a concentração de H₃PO₄ em 30 mmol L^{-1} ; tensão aplicada, 20 kV; e temperatura de 25 °C. A Tabela 2.2 indica as variáveis avaliadas no novo planejamento.

Tabela 2.2 - Planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central.

Variáveis	Fator	Nível		
		-1	0	+1
1	[Metanol], %	20	25	30
2	[SDS], $mmol L^{-1}$	80	90	100

Fonte: o próprio autor.

A resposta para o planejamento fatorial completo foi gerada a partir da razão entre o produto da diferença entre as mobilidades dos pares adjacentes e o tempo de análise, de acordo com a Equação 1.

$$R = \frac{\prod[\mu_{app\ i+1} - \mu_{app\ i}]}{t_{final}} \quad (1)$$

Onde, $\mu_{app\ i}$ e $\mu_{app\ i+1}$ são as mobilidades aparentes dos compostos adjacentes. A mobilidade aparente pode ser calculada pela seguinte equação (LANDERS, 2008):

$$\mu_{app} = \mu_{ef} + \mu_{eo} \quad (2)$$

Onde, μ_{ef} e μ_{eo} são as mobilidades eletroforética e eletrosmótica, respectivamente. Nessa equação, a contribuição efetiva do fluxo eletrosmótico é considerada durante a separação. Em pH 2 o fluxo eletrosmótico possui mobilidade negligenciável, portanto, μ_{eo} é considerada zero (LANDERS, 2008). A Equação 3 pode ser descrita assim:

$$\mu_{app} = \frac{L_{det}}{t_m E} = \frac{L_{det} L_{tot}}{t_m V} \quad (3)$$

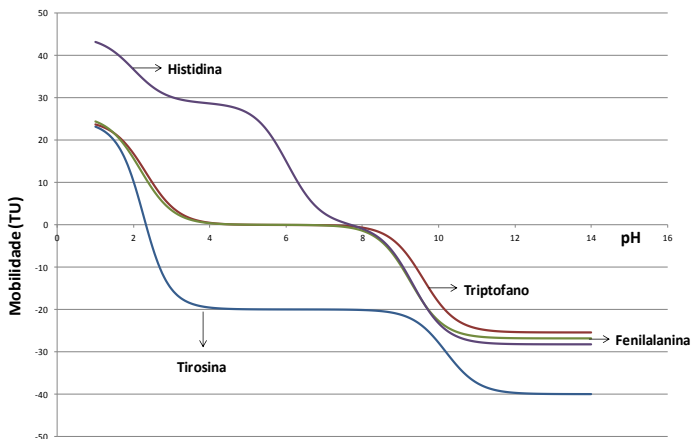
Onde, L_{det} é a distância da extremidade de injeção até a posição onde está localizado a janela de detecção, t_m é o tempo de migração do íon, V é a diferença de potencial aplicada e L_{tot} é o comprimento total do capilar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTOS PARA TRIAGEM DAS VARIÁVEIS

Os aminoácidos possuem a capacidade de ionização, propriedade muito explorada na maioria dos métodos de separação envolvendo esses compostos. A Figura 2.3 mostra o gráfico de mobilidade efetiva *versus* pH. Esse gráfico foi obtido a partir de equações pertinentes e banco de dados (contendo constantes de dissociação ácido-base e mobilidades iônicas de mais de 370 solutos) que foram incorporados em um arquivo (Microsoft® Excel 97). A programação e concatenação das planilhas individuais foram feitas usando os recursos do *software* (macros programadas em visual basic). Essa ferramenta valiosa para avaliação preliminar de uma separação é denominada *SIMULSC* (MICKE, 2005), e auxilia na indicação das regiões de pH em que as mobilidades das substâncias diferem mais, conseqüentemente sendo a região mais susceptível de se alcançar a separação.

Figura 2.3 - Curvas de mobilidade *versus* pH para os aminoácidos



Fonte: *software* SIMULSC adaptado (MICKE, 2005).

A Figura 2.3 indica que em valores próximo a pH 11 a diferença nas mobilidades dos quatro aminoácidos possibilitaria a separação dos mesmos. É importante ressaltar que não é possível realizar a previsão precisa do pH ótimo, uma vez que os dados utilizados no cálculo da mobilidade efetiva estão corrigidos para diluição infinita. Por isso, as mobilidades geradas por cálculos podem não concordar inteiramente com os medidos experimentalmente na força iônica do eletrólito de corrida (FUJIYA; TAVARES, 2003).

O tetraborato de sódio (TBS) é um eletrólito muito utilizado na análise em eletroforese capilar, pois apresenta características interessantes: fácil preparação (desejável para se obter boa robustez do método); o pK_a do TBS é 9,36, o que é interessante, pois nesse pH os

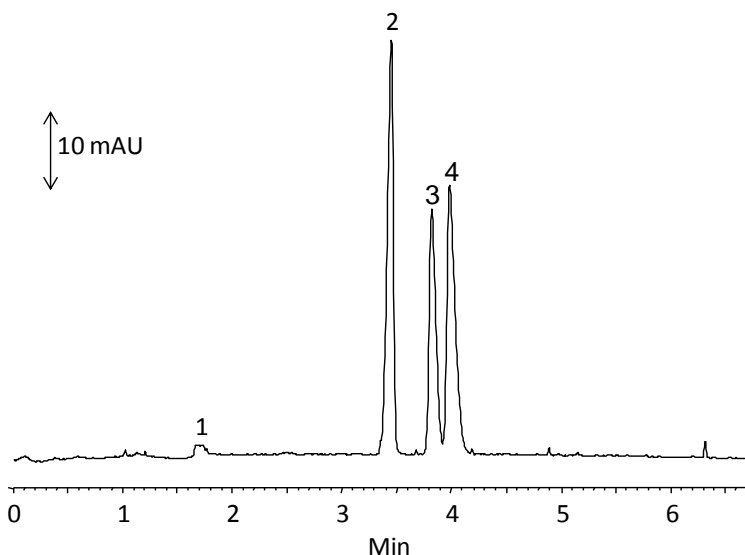
aminoácidos estão dissociados, na forma aniônica. Entretanto, o pH ainda não seria o ideal, indicado pelo gráfico de mobilidade *versus* pH. Uma alternativa, seria o ajuste do pH com NaOH até a região satisfatória de pH (11), mantendo a capacidade tamponante do meio, característica desejável em separações por eletroforese capilar para que ocorra a manutenção do pH durante as análises. Entretanto, quanto maior a concentração do eletrólito de corrida, maior a força iônica do meio e conseqüentemente menor o fluxo eletrosmótico. Como a intenção é alcançar um método rápido de análise, e em pH alto o fluxo eletrosmótico é o responsável por conduzir os analitos até o detector, quanto menor o fluxo, mais lentos os analitos se comportarão. De acordo com o que foi exposto, descartou-se a possibilidade de separação dos analitos em pH alto.

Uma segunda abordagem foi a utilização de meio micelar durante a separação, para isso foi utilizado um tensoativo aniônico (SDS) como componente do eletrólito de corrida contendo TBS (pH 9,3). Com isso, esperava-se explorar uma possível diferenciação das mobilidades eletroforéticas dos compostos, entretanto a separação não foi alcançada, ou seja, os analitos não apresentaram variação de mobilidade significativa, fato atribuído a uma possível repulsão eletrostática entre os analitos e as micelas de SDS.

Ainda de acordo com o gráfico, outra região em potencial seria por volta de pH 2. Uma tentativa foi a utilização de um eletrólito de corrida composto por ácido glutâmico, pH 2,1 ajustado com HCl. A escolha do ácido glutâmico se deu pela semelhança de mobilidade com a fenilalanina, minimizando efeitos eletrodispersivos, o que acarretariam

na perda da eficiência dos picos (BAKER, 1995). Entretanto, a utilização desse eletrólito de corrida em diferentes concentrações não resultou na separação dos analitos em linha de base. A Figura 2.4 representa um dos experimentos realizados utilizando ácido glutâmico 20 mmol L^{-1} , pH 2,1 ajustado com HCl como eletrólito de corrida.

Figura 2. 4 - Eletroferograma dos padrões de His (1); Trp (2); Phe (3); Tyr (4). Eletrólito constituído por 20 mmol L^{-1} de ácido glutâmico, pH 2,1 ajustado com HCl; capilar, 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm de comprimento efetivo; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; tensão 30 kV, polaridade positiva; injeção hidrodinâmica 50 mbar durante 3 s; comprimento de onda 200 nm.



Fonte: o próprio autor.

É possível visualizar no eletroferograma que, apesar da separação quase em linha de base dos picos, foi necessária a utilização de um capilar de 48,5 cm. Caso contrário, a injeção pela extremidade mais próxima do detector não proporcionaria a separação dos compostos. O mesmo comportamento foi observado para outras a faixa de pH entre 2,1 e 2,5.

A separação de solutos neutros, quando em presença de micelas aniônicas, é baseado na partição modulada pela concentração de micelas (e monômeros), enquanto que para solutos carregados positivamente a interação ocorre através de pareamento iônico (HUIE, 2003). Portanto, permanecendo no intuito de buscar um método rápido, optou-se por avaliar a utilização de H_3PO_4 , pH 2, com a utilização de SDS para que fosse explorada a possível interação analito – micela na separação dos aminoácidos com os analitos totalmente protonados.

Observou-se que com o aumento da concentração de SDS houve uma significativa redução do tempo de análise. Ainda, a variação de H_3PO_4 mostrou influência, mesmo que não tão pronunciada quanto a de SDS.

A adição de solventes orgânicos ao eletrólito de corrida tem demonstrado em muitos estudos um aumento da solubilidade, detectabilidade, resolução e controle do fluxo eletrosmótico (LIU et al., 1999; HUIE, 2003; BRETNALL e CLARKE, 1995).

A utilização de solventes orgânicos (acetonitrila, etanol e metanol) foi avaliada isoladamente. Os resultados indicaram um aumento da resolução e sinal na presença de metanol, enquanto que os outros solventes provocaram, na maioria das vezes, um alargamento das

bandas eletroforéticas, e conseqüentemente perdas na resolução entre picos adjacentes.

Os íons no meio eletroforético migram como resultado do campo elétrico aplicado ao longo do tubo capilar, quanto maior o campo menor o tempo de análise. Altos valores de campo aplicado podem levar a um desvio da Lei de Ohm, desvio causado por uma ineficiente dissipação do calor gerado dentro do capilar, causando efeitos indesejáveis à separação como, por exemplo, instabilidade e perda de resolução. Altas concentrações de eletrólito reduzem a faixa linear da Lei de Ohm, (LANDERS, 2008) desvio causado por uma ineficiente dissipação do calor gerado dentro do capilar, causando efeitos indesejáveis à separação como, por exemplo, instabilidade e perda de resolução. Altas concentrações de eletrólito reduzem a faixa linear da Lei de Ohm. A variação da tensão aplicada durante os experimentos preliminares demonstraram que a tensão interferiu na resolução entre os picos. Ainda foi observada uma variação do tempo de migração com a variação da temperatura, o que se dá pela mudança da viscosidade do eletrólito de separação no interior do tubo capilar (LANDERS, 2008).

Selecionadas as variáveis que influenciariam na separação dos quatro aminoácidos, o planejamento fatorial fracionário foi executado.

3.2 CONSTRUÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

Existem diferentes tipos de planejamentos fatoriais fracionários descritos na literatura, como, por exemplo, as frações 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...1/2^b de um planejamento 2^{k-b}, em que *k* é o número de variáveis e

b é o tamanho da fração. O tamanho da fração influenciará no possível número de efeitos a serem estimados e, conseqüentemente, no número de experimentos necessários (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Devido a inúmeras variáveis envolvidas na análise, e que estão diretamente relacionadas à qualidade dos resultados, a otimização multivariada foi escolhida como ferramenta auxiliar. Foi conduzido um planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo $2v^{5-1}$, primeiramente para avaliar o efeito e significância das variáveis em estudo, bem como possíveis interações entre essas.

Utilizando-se como variáveis: a concentração de H_3PO_4 (30-40 $mmol L^{-1}$); % de metanol (10-30%); concentração de SDS (60-100 $mmol L^{-1}$); tensão (20-30 kV) e temperatura (20-25 °C). Foram mantidos constantes os parâmetros de injeção em 50 mbar durante 3 s (hidrodinâmica).

Os ensaios envolvidos no planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo $2v^{5-1}$ para cada experimento estão representados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Experimentos envolvidos no planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$

Experimento	Tensão (kV)	MeOH (%)	H₃PO₄ (mmol L⁻¹)	SDS (mmol L⁻¹)	Temperatura (°C)
1	20	10	30	60	25
2	30	10	30	60	20
3	20	30	30	60	20
4	30	30	30	60	25
5	20	10	40	60	20
6	30	10	40	60	25
7	20	30	40	60	25
8	30	30	40	60	20
9	20	10	30	100	20
10	30	10	30	100	25
11	20	30	30	100	25
12	30	30	30	100	20
13	20	10	40	100	25
14	30	10	40	100	20
15	20	30	40	100	20
16	20	30	40	100	25

Continua

Continuação

Experimento	Tensão (kV)	MeOH (%)	H₃PO₄ (mmol L⁻¹)	SDS (mmol L⁻¹)	Temperatura (°C)
17	25	25	35	80	22,5
18	25	25	35	80	22,5
19	25	25	35	80	22,5

Fonte: o próprio autor.

Devido ao número elevado de eletroferogramas gerados a partir do planejamento fracionário, os resultados serão discutidos sem a apresentação dos mesmos.

Os eletroferogramas dos ensaios 1, 2, 5 e 6 apresentaram perfis similares, sendo possível a separação de três compostos de um total de quatro em um tempo de análise em torno de 1,5 minutos. Nessas condições, a concentração de H₃PO₄ variou, juntamente com a temperatura e tensão aplicadas, enquanto as concentrações de SDS e MeOH permaneceram constantes em 60 mmol L⁻¹ e 10%, respectivamente. Um comportamento semelhante foi observado nos experimentos 3, 4, 7 e 8, entretanto a separação de apenas três compostos foi mais lenta, com tempos de análise em torno de 4,0 minutos. Nesses ensaios foram mantidos 30 % de MeOH e 60 mmol L⁻¹ de SDS, enquanto que a variação dos outros parâmetros podem ser visualizados na Tabela 2.3. O aumento do tempo da análise indicou que a proporção de MeOH exerce influência na separação e,

consequentemente, no tempo de migração de cada analito e tempo final de análise. Os experimentos 9, 10, 13 e 14, apresentaram perfil similar e separação incompleta da fenilalanina e histidina, e o tempo de corrida foi menor que 1,5 minutos, ainda que na concentração mais alta de SDS 100 mmol L^{-1} , sinalizando para a influência significativa no comportamento dos analitos, associado à baixa concentração de MeOH, o qual também não variou durante essas 4 corridas, permanecendo em 10%, fato que pode explicar a co-migração dos analitos. Os experimentos envolvendo o ponto central, 17, 18 e 19 não apresentaram diferença significativa em relação ao tempo de análise, quando comparados aos experimentos 9, 10, 13 e 14, entretanto, os picos correspondentes a fenilalanina e histidina apresentaram a separação em linha de base, entretanto, muito próximos (Resolução 1). Esse comportamento poderia comprometer a separação da fenilalanina durante a análise das amostras em função da complexidade da matriz. Finalmente, os experimentos 11, 12, 15 e 16 apresentaram perfil similar, separação completa de todos os constituintes e tempo de análise de até 3,5 minutos. Estes resultados foram interessantes, pois a resolução entre todos os picos adjacentes ocorre em linha base, salvo para o experimento 16. A diferença de potencial aplicada e a temperatura não podem ser negligenciadas como fator de otimização, pois muitas separações podem ser alcançadas apenas com a variação desses parâmetros. Entretanto, o objetivo dos experimentos foi avaliar a influência das variáveis na separação de todos os aminoácidos em linha de base, e a modificação desses parâmetros na faixa estudada apresentou pouca interação com as outras variáveis do planejamento. A concentração de H_3PO_4 também não apresentou efeito significativo.

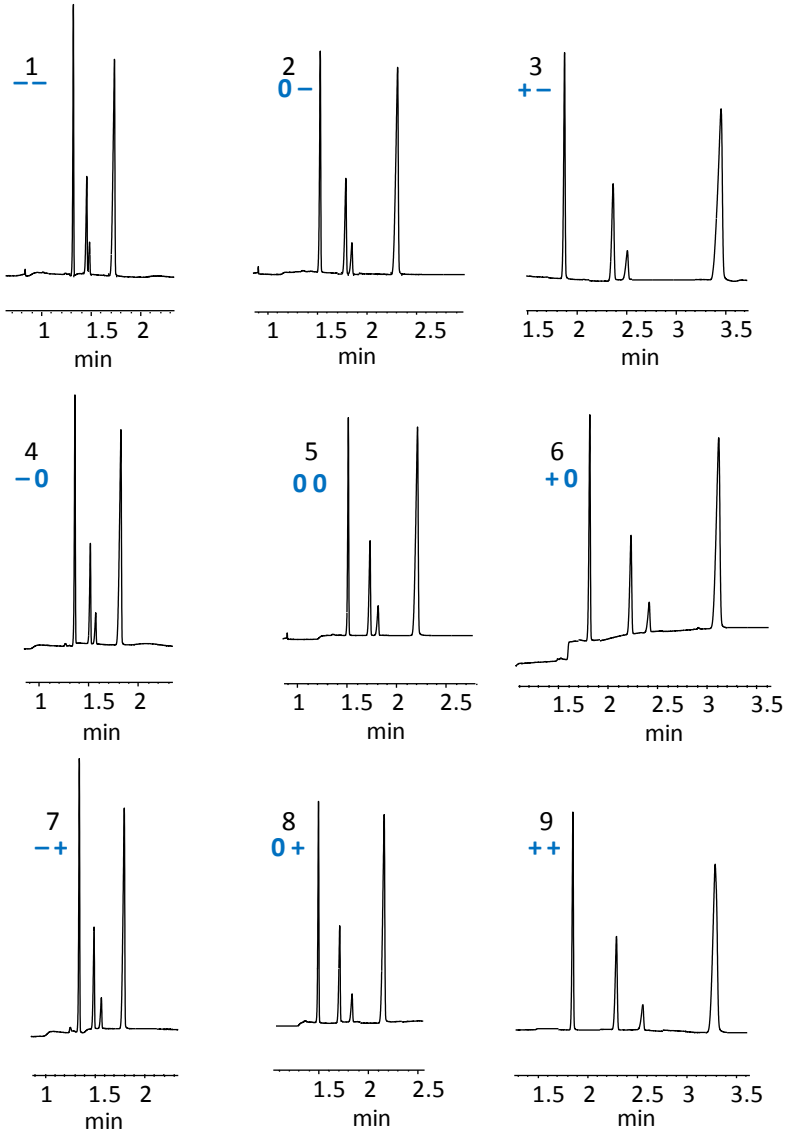
Desta maneira, os resultados do planejamento avaliados qualitativamente do fatorial fracionário, indicaram de que as variáveis % MeOH e concentração de SDS causam significativo efeito na separação dos aminoácidos.

3.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2 COM PONTO CENTRAL

O planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$ realizado foi reduzido a um planejamento 3^2 com triplicata no ponto central, tendo sido retiradas as variáveis concentração H_3PO_4 , tensão aplicada e temperatura. Foram considerados e mantidos fixos, os níveis baixos para concentração de H_3PO_4 e tensão aplicada, 30 mmol L^{-1} e 20 kV (polaridade negativa), e no nível alto a temperatura, $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta redução visa simplificar a análise dos resultados e a partir da avaliação da superfície de resposta encontrar o ótimo de separação. As variáveis estudadas no novo planejamento com ponto central para avaliação da superfície de resposta foram: MeOH (20 – 30%) e concentração de SDS ($80 - 100 \text{ mmol L}^{-1}$).

Os eletroferogramas obtidos com o planejamento fatorial completo 3^2 estão representados na Figura 2.5.

Figura 2. 5 - Eletroferogramas correspondentes aos experimentos realizados no planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central. Ordem de migração: Trp; Phe; Hist e Tyr.



Fonte: o próprio autor.

3.4 MECANISMO DE SEPARAÇÃO

O pH no interior do tubo capilar é ditado pelo pH do eletrólito de corrida (pH \approx 2), portanto quando a polaridade negativa é aplicada na extremidade de injeção, o fluxo eletrosmótico migrará na direção do cátodo com mobilidade negligenciável, não interferindo na separação dos analitos. A migração dos compostos de estudo foi modulada pela presença de micelas aniônicas, portanto, os aminoácidos (mesmo protonados) migram eletroforeticamente em direção ao ânodo, com aplicação de polaridade negativa no lado da injeção. Esses analitos interagem com a carga negativa da micela, responsável pela condução dos mesmos até o detector; portanto, quanto maior a interação dos analitos com as micelas aniônicas, maior será a velocidade final/aparente de migração dos mesmos, na direção do anodo.

A presença de metanol no eletrólito de corrida foi responsável por modificações nas propriedades físico-químicas do meio, causando uma diminuição ainda mais pronunciada na mobilidade do fluxo eletrosmótico. Já os analitos terão seus raios de hidratação alterados em relação ao meio aquoso e, poderão também apresentar uma mudança em seu comportamento de dissociação. Ainda, a estrutura da micela pode ser alterada em meio hidro-orgânico. Assim, tanto os analitos quanto as fases micelar e aquosa experimentam modificações, o que acarreta em alterações nas interações entre as micelas e os compostos de estudo.

Todos esses fatores somados foram os responsáveis pelas modificações nas mobilidades dos compostos, o que alterou a seletividade e pôde proporcionar a separação dos analitos.

3.5 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A escolha da função resposta para avaliar os experimentos é uma tarefa difícil em vista da complexidade da matriz e da presença dos pares críticos Phe e His.

A resposta para o planejamento fatorial completo 3^2 com triplicata no ponto central foi gerada pela razão entre o produto da diferença entre as mobilidades dos pares adjacentes e o tempo de análise. As variáveis, níveis estudados e respostas geradas estão dispostos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central e respostas.

Experimentos	X1	X2	Resposta (x 10^{-17})
1	-1	-1	4,82
2	0	-1	5,31
3	1	-1	5,38
4	-1	0	6,01
5	0	0	6,56
6	1	0	6,95

Continua

Continuação

Experimentos	X1	X2	Resposta (x 10⁻¹⁷)
7	-1	1	6,96
8	0	1	8,06
9	1	1	8,01
10	0	0	7,85
11	0	0	7,81

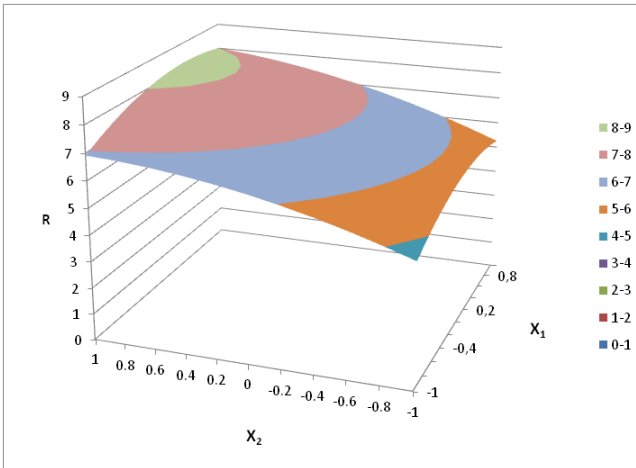
X₁ (metanol %, v/v): (-1): 20; (0): 25; (1): 30.

X₂ (SDS, mmol L⁻¹): (-1): 80; (0): 90; (1): 100. Fonte: o próprio autor.

Considerando a resposta avaliada, ou seja, a razão do produto da diferença entre as mobilidades dos pares adjacentes e o tempo de análise dos aminoácidos estudados: quanto maior o valor calculado, maior a resolução entre os picos e menor o tempo de análise; valores iguais a zero indicam que houve co-migração entre pelo menos dois pares adjacentes (numerador = 0). A avaliação qualitativa associada ao maior valor da resposta permitiu concluir que o experimento 8 apresentou a condição que se desejava apesar de ter sido possível a separação dos quatro aminoácidos em todos os ensaios realizados. Logo, o experimento 8 foi considerado o ótimo, pois apresentou o menor tempo de análise para a separação em linha base dos três pares de picos adjacentes, com espaçamento uniforme e resolução acima de 1,5.

Uma vez implementado o modelo matemático e, verificado que não há evidência de falta de ajuste para o modelo no intervalo de confiança estipulado, a modelagem por superfície de resposta pôde ser implementada (Fig. 2.6).

Figura 2.6 - Gráfico de superfície de resposta do planejamento fatorial 3^2

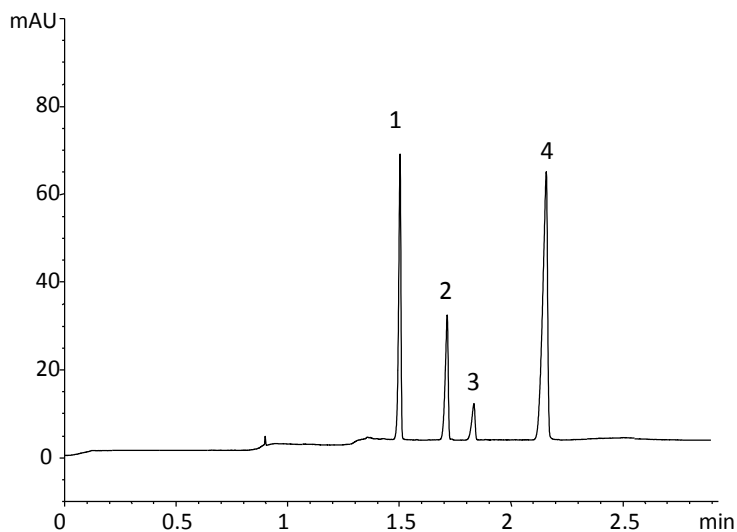


Fonte: o próprio autor, software Excel 2007.

Pela superfície de resposta infere-se que a resposta tende a ser maior à medida que percorremos a região central para o nível alto da variável X_1 (MeOH) e para um nível alto e constante da variável X_2 (SDS). A superfície de resposta direciona o ótimo de separação associado a um aumento de concentração maior de SDS. Contudo, o aumento dessa concentração no eletrólito de corrida foi limitada pelo aumento da condutividade do eletrólito de corrida resultando em valores de corrente elevados, o que prejudicaria a separação pela perda de estabilidade do sistema, formação de bolhas, deformação dos picos pelo desvio da linearidade da lei de Ohm. Sendo, portanto, o eletrólito otimizado nas condições: H_3PO_4 30 mmol L^{-1} ; SDS 100 mmol L^{-1} ; MeOH 25% (v/v).

O estudo envolvendo planejamento fatorial foi de extrema importância na escolha dos níveis “ótimos” dos fatores estudados, uma vez que foi possível variar todos ao mesmo tempo e entender a importância de cada um no sistema. A Figura 2.7 mostra o eletroferograma dos padrões de aminoácidos na condição ótima indicada pelo planejamento fatorial.

Figura 2.7- Eletroferograma dos padrões de aminoácidos: (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr na concentração de 100 mg L^{-1} . Eletrólito de corrida: H_3PO_4 30 mmol L^{-1} , SDS 100 mmol L^{-1} , MeOH 25% (v/v); Condições experimentais: injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 s; tensão, 20 kV; polaridade negativa; temperatura, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; comprimento de onda, 200 nm



Fonte: o próprio autor.

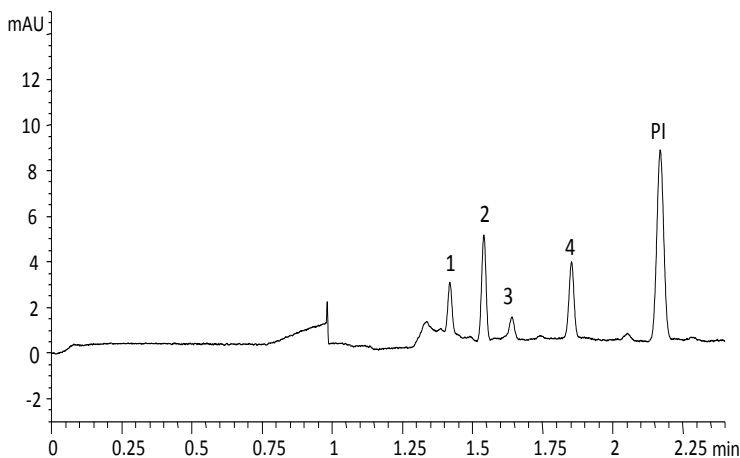
A utilização de um padrão interno melhora substancialmente a precisão dos resultados, minimizando possíveis erros de injeção do equipamento. Conseqüentemente, quando escolhido corretamente, ocorre uma melhora pronunciada na linearidade do método, o que compensa possíveis flutuações provenientes da composição da matriz (WATZIG; DEGENHARDT e KUNKEL, 2005).

A escolha do padrão interno baseou-se principalmente na semelhança estrutural com os compostos de estudo, conseqüentemente, na semelhança da mobilidade eletroforética; e na ausência do mesmo na matriz estudada. Foram avaliados como possibilidade de escolha como padrão interno os compostos sintéticos: ácido difenilacético; ácido 3,5-dihidroxibenzóico e salbutamol.

Os resultados indicaram que o ácido 3,5 dinitrobenzóico mostrou-se adequado como padrão interno, pois apesar de aumentar o tempo de análise entre todos os compostos avaliados foi o único que não co-migrou com os outros analitos.

O método proposto foi aplicado a uma amostra de cereal (flocos de milho, arroz e trigo) após hidrólise ácida ($\text{HCl } 5,7 \text{ mol L}^{-1}/105 \text{ }^\circ\text{C}/24 \text{ h}$) do mesmo (Fig. 2.8).

Figura 2.8 - Eletroferograma de uma amostra de cereal a base de milho, arroz e trigo hidrolisada. Para condições experimentais consultar Fig. 2.7



Fonte: o próprio autor.

O eletroferograma da amostra de cereal analisada ilustra a potencialidade do método desenvolvido para determinação de fenilalanina em amostras hidrolisadas de cereais, uma vez que não foi detectada a presença de interferentes que pudessem prejudicar a sua quantificação. O tempo de análise alcançado foi satisfatório e permitirá uma alta frequência analítica quando explorado para esse tipo de análise.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os planejamentos utilizados durante a otimização do método de separação dos aminoácidos, fatorial central e completo, determinaram quais fatores apresentavam efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator variou com os níveis dos outros fatores. Além disso, permitiu estabelecer e quantificar as correlações entre os diferentes fatores. Diante do exposto, verificou-se que sem o uso dos planejamentos fatoriais, importantes interações entre fatores poderiam não ter sido detectadas e a otimização máxima do sistema poderia levar mais tempo para ser alcançada e estaria baseada na tentativa e erro. Isto foi evidenciado neste trabalho, confirmando que os sistemas multivariados, fundamentados em planejamento fatorial de experimentos, permitem viabilizar o reconhecimento de condições de ótimo verdadeiro a partir de um reduzido número de experimentos.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. W. C.; ANCONI, C. P. A.; NOVATO, W. T. G.; Oliveira, M. A. L. de; ALMEIDA, W. B.; dos Santos, H. F. Box Behnken design for studying inclusion complexes of triglycerides and α -cyclodextrin: application to the heating protocol in molecular-dynamics simulations. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 71, p. 103-111, 2011.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

BALLUSA, C. A.; MEINHARTA, A. D.; BRUNS, R. E; GODOY H. T. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, p. 1181-1187, 2011.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: Design, Inovation and Discovery**. 2. ed. New York: Wiley, 2005.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: Wiley, 1978.

BRETNALL, A. E., CLARKE, G. S. Investigation and optimization of the use of organic modifiers in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 716, n. 1-2, p. 49-55, nov. 1995.

CAPELLA-PEIRO, M. E.; BOSSI A.; ESTEVE-ROMERO J. Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis

method for the simultaneous separation of antihistamines. **Analytical Biochemistry**, v. 352, p. 41-49, 2006.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. ed. São Paulo: Ed. Artmed, 2009.

EHLEN, J. C.; ALBERS H. E.; BREYER E. D. MEKC-LIF of γ -amino butyric acid in microdialysate: Systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 147, p. 36-47, 2005.

FUJIYA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Analysis of underivatized amino acids in protein hydrolysates for cosmetic application by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 562-568, 2003.

HUIE, C. W. Effects of organic solvents on sample pretreatment and separation performances in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 10, p. 1508-1529, 2003.

LANDERS, J. P. **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3. ed. Boca Raton: Ed. CRC Press, 2008.

LEWIS, S.W.; SWANN, L.M.; FORBES, S.L. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. **Talanta**, v. 81, p. 1697-1702, 2010.

LIU, Z., ZOU, H., YE, M., NI, J., ZHANG, Y. Effects of organic modifiers on solute retention and electrokinetic migrations in micellar electrokinetic capillary chromatography. **Electrophoresis**, v. 20, n. 1-2, p. 49-55, 1999.

MEINHARTA A. D.; BALLUSA C. A.; BRUNS R. E.; PALLONEA, J. A. L.; GODOY H. T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, p. 237–244, 2011.

MICKE G. A.; FUJIYA N. M.; TONIN F. G.; COSTA, A. C. O.; TAVARES, M. F. M. Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1625–1632, 2006.

MICKE, G. M. **Otimização e simulação em eletroforese capilar**. 2004. 281p. Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4th ed. New York: Wiley, 1997.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

POLONINI, H. C.; OLIVEIRA, M. A. L. de; FERREIRA, A. O.; RAPOSO, N. R. B.; GROSSI, L. N.; BRANDÃO, M. A. F. Optimization of a new dissolution test for oxcarbazepine capsules using mixed-level factorial design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1263-1270, 2011.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Ed. Blucher, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2.ed. Campinas: Editora Caritá, 2009.

TEÓFILO R. F.; FERREIRA M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

WATZIG, H., DEGENHARDT, M., KUNKEL, A. Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16-17, p. 2695-2752, 2005.

CAPÍTULO 3: Validação de método intralaboratorial para determinação de fenilalanina, triptofano, tirosina e histidina em cereais por cromatografia eletrocínética micelar

1. INTRODUÇÃO

1.1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação de métodos analíticos é o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método estudado possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação, incluindo a determinação dos parâmetros de desempenho e das limitações de um método, estabelecendo quais influências podem alterá-lo e demonstrando que o método é adequado para uso (EURACHEM, 1993; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; MAC NEIL; PATTERSON; MARTZ, 2000).

O laboratório deve validar os métodos normalizados que são utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios (INMETRO, 2010; ABNT, 2005).

Métodos analíticos confiáveis são necessários para a avaliação da conformidade dos produtos com as regulamentações nacionais e internacionais em todas as áreas de análise. A validação de métodos é, por isso, um componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar para que ele produza dados analíticos confiáveis (THOMPSON et al., 2002).

Os estudos de validação devem ser representativos, cobrir as faixas de concentração e abranger os diferentes tipos de amostras dentro

do escopo do método (THOMPSON et al., 2002). É imprescindível que no processo de validação os estudos para determinação dos parâmetros de desempenho sejam realizados utilizando equipamentos dentro das especificações, em boas condições de trabalho e adequadamente calibrados. Da mesma forma, o analista envolvido nos estudos deve ser competente na área em questão e ter conhecimento suficiente para ser capaz de tomar decisões apropriadas a partir de suas observações (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando o mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes matrizes (EC, 2002). Este procedimento de validação tem sido internacionalmente aceito, uma vez que existem diversos protocolos oficiais, entre eles: AOAC (1998 b); EURACHEM (1998); EC (2002); ISO e IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002); INMETRO (2003) e ANVISA (2012).

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial a serem estudados em um determinado protocolo são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, faixa de trabalho, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade e robustez. Estes parâmetros variam de acordo com a técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação a ser seguido. No Brasil os órgãos que regulamentam a validação dos métodos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

Neste trabalho, foram avaliados os parâmetros adotados pela EURACHEM (1998), em que a metodologia será considerada validada a

partir da verificação de parâmetros recomendados por este órgão, a saber: faixa de trabalho e faixa linear; confirmação de identidade, especificidade e seletividade; repetitividade; precisão intermediária, reprodutibilidade intralaboratorial; recuperação; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão e robustez (EURACHEM, 1998).

2. VALIDAÇÃO

2.1 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (pelo equipamento) e a massa ou concentração da substância a ser quantificada (RIBANI et al., 2004). O ideal é que a relação entre a resposta do instrumento e a concentração seja linear, mas não é obrigatório, o importante é haver repetitividade da curva em dias diferentes (EURACHEM, 1998).

Os experimentos descritos para avaliação da linearidade envolvem preparo de curvas com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, e com um mínimo de duas a sete replicatas independentes por nível. Os níveis de concentração devem ser equidistantes ao longo da faixa estudada e cada nível deve corresponder a uma solução padrão preparada de forma independente, desaconselhado o preparo das soluções por diluições sucessivas (ISSO, 1996; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

Também é recomendado que as medidas sejam realizadas de forma aleatória para garantir a independência dos resultados (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Alguns autores recomendam a avaliação do coeficiente de correlação como indicador de linearidade (ICH, 1996; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; INMETRO,

2003), mas o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é consenso entre os protocolos para avaliação da linearidade, assim como a estimativa dos parâmetros e dos resíduos da regressão, além da inspeção visual do gráfico de x - y e do gráfico de resíduos da regressão (ISO, 1996; AOAC, 1998 b; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003; ICH, 1996).

Embora a inspeção visual dos gráficos seja propensa a erros de interpretação, podem ser bastante informativos para identificação de valores extremos e pontos de dispersos, chamado *outliers*, ou seja, pontos distantes dos demais pontos ao longo do eixo x , que afetam diretamente as estimativas dos parâmetros da equação da curva de calibração (BURKE, 2001; MEIER & ZUND, 1993; ISO, 1996). Estatísticas mais formais de diagnósticos como as baseadas no cálculo do resíduo padronizado, resíduo *studentizado*, distância de Cook, resíduo padronizado Jackknife e teste de Grubbs, por exemplo, são úteis para a exclusão de valores extremos, que podem ser excluídos num máximo de 22,2% do número original de resultados (ARMITAGE & BARRY, 1994; BARRET & LEWIS, 1994; HORWITZ, 1995).

Existem aproximadamente 40 testes para avaliar a distribuição normal de uma variável, desde testes gráficos que incluem histogramas e gráficos de normalidade, a testes estatísticos que abrangem testes de hipótese, como Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, entre outros (D'AGOSTINO & STEPHENS, 1986; DANSCHKE & HENZE, 1989). O teste de Kolmogorov-Smirnov é utilizado para amostras grandes ($n > 30$) e propõe um teste de normalidade baseado na correlação linear entre as estatísticas observadas ordenadas e os valores

esperados de uma distribuição normal, em uma tabela de valores críticos (MONTGOMERY & RUNGER, 1994).

Além da possibilidade da verificação da homoscedasticidade pela inspeção visual dos gráficos de regressão de resíduos (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998), há vários testes formais possíveis para a avaliação da homogeneidade das variâncias, como os testes de Cochran, Levene, Bartlett, entre outros (BURKE, 2001; LEVENE, 1960; DANZER & CURRIE, 1998). O teste de Bartlett permite que o número de replicatas seja igual ou desigual (DANZER & CURRIE, 1998).

Se houver heteroscedasticidade, é possível criar uma variável transformadora e testá-la novamente para a homogeneidade das variâncias (JUNKEIRA; SOUZA; GINN, 2005).

Uma correlação seriada dos resíduos da regressão é chamada autocorrelação e pode subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança (JUNKEIRA; SOUZA; GINN, 2005). Em testes de hipóteses, pode levar a inferências equivocadas, indicando falsa significância dos regressores (DRAPER & SMITH, 1998). O teste de Durbin-Watson, avalia a aleatoriedade dos resíduos da regressão, sendo frequentemente aplicado para determinar autocorrelação de primeira ordem (DURBIN-WATSON, 1951; DRAPER & SMITH, 1998). No caso de dados autocorrelacionados, são recomendadas transformações dos dados (JUNQUEIRA; SOUZA; GINN, 2005).

Os coeficientes de determinação e correlação apesar de serem amplamente recomendados como indicador de linearidade (ICH, 1996;

BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003), não são adequados para este propósito, pois indicam apenas o grau de ajuste dos dados à curva, independentemente do modelo (JUNKEIRA; SOUZA; GINN, 2005; BURKE, 2001).

2.2 EFEITOS DE MATRIZ

Efeito de matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral. O efeito de matriz pode causar alterações na análise, como mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo e componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Os estudos de efeito de matriz são realizados com o preparo de curvas de calibração simples em solventes apropriados e com adição do analito em matriz isenta ou através da adição de níveis de padrão conhecido na própria matriz (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2003). Frente a dificuldade de se encontrar matrizes isentas, principalmente em alimentos, pode-se fazer uso de uma solução eletrolítica, ou seja, uma solução que simula características da matriz e adicionar concentrações conhecidas do analito (CAVAZZA et al., 2010).

Para avaliar o então efeito de matriz, o teste F (Fischer-Snedecor), é recomendado para verificar se as variâncias dos ensaios realizados na matriz e em solução aquosa, podem ser consideradas

estatisticamente iguais, em cada nível de concentração estudado, quando os graus de liberdade são iguais ou diferentes para as distribuições. Este teste tem a vantagem de envolver todos os níveis de concentração estudados, porém, é necessário a verificação das premissas, quanto a normalidade e a homogeneidade das variâncias (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

2.3 SELETIVIDADE

A seletividade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes que podem interferir em matrizes complexas, avaliando o grau de interferência de espécies com outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura, presentes na matriz. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN et al., 2001; EURACHEM, 1998).

2.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação e adição de padrão (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Na área de alimentos, materiais de referência certificados são escassos e dispendiosos, principalmente devido às dificuldades no preparo, homogeneização e garantia de estabilidade durante armazenamento. Quando não existe este tipo de material, uma amostra branca da matriz de interesse ou a própria matriz pode ser adicionada de quantidades conhecidas de analito na forma de material puro, para ensaios de recuperação aparente (AOAC, 1998 b; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2003; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; EURACHEM, 1998; EC, 2002). Na maioria das vezes, amostras adicionadas não representam fielmente a forma na qual o analito se encontra na matriz, fornecendo uma impressão pouco realista de eficiência dos processos de extração (EURACHEM, 1998). Em decorrência disto, recuperações aparentes satisfatórias em amostras adicionadas não são garantia de exatidão, mas recuperações aparentes insatisfatórias são indicativos de falta de exatidão (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Ensaio das mesmas amostras pelo método em validação e por outro método de referência também são utilizados para avaliação da exatidão (AOAC, 1998; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2003; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; EURACHEM, 1998; EC, 2002).

2.5 PRECISÃO

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma

amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2007).

Precisão é dependente da concentração do analito, devendo ser determinada para diferentes concentrações. Na literatura sobre validação intralaboratorial de métodos, um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível é recomendado (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2003; EC, 2002). Para EURACHEM (1998), um mínimo de seis concentrações com dez replicatas independentes para cada nível é recomendado. As três formas mais comuns de expressá-la, são por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

A repetitividade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos ou diferentes tempos (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

2.6 LIMITES DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado de três formas: (RIBANI et al., 2004):

i) *Método visual*: o LD é determinado através da comparação da adição de baixas concentrações conhecidas do analito, de tal modo que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado, distinguindo-o do ruído.

ii) *Método da relação sinal/ruído*: o LD é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco da amostra. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal/ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

iii) *Método baseado em parâmetros da curva analítica*: o LD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação:

$$LOD = 3,3x \frac{s}{S} \quad (1)$$

onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica e S é a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

Segundo o EURACHEM, dez amostras brancas independentes devem ser fortificadas com concentrações baixas confiáveis do analito em estudo, e os resultados devem ser expressos como três vezes o desvio padrão (EURACHEM, 1998).

2.7 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, só que desta vez, utilizando a relação sinal/ruído de 10:1. O LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou o método baseado em parâmetros da curva analítica, de acordo com a Equação 2:

$$LOQ = 10x \frac{s}{S} \quad (2)$$

onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica e S é a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

2.8 ROBUSTEZ

A robustez de um procedimento analítico é uma medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas variações dos parâmetros do método e fornece uma indicação da sua segurança durante o uso normal (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método avalia a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações e, para determiná-la recomenda-se o *teste de Youden*, que permite não apenas avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada um dos parâmetros analíticos nos resultados finais. A ideia principal do teste não é avaliar a alteração de um parâmetro individualmente, mas introduzir várias alterações nas condições analíticas ao mesmo tempo, de maneira que o efeito de cada alteração individual possa ser avaliado no final (YOU DEN & STEINER, 1975; INMETRO, 2003).

Os testes de robustez servem para indicar os fatores que podem influenciar significativamente a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório (CESAR; PIANETTI, 2009).

Esse estudo teve como objetivo a validação analítica intralaboratorial para o método proposto para determinação de fenilalanina em amostras de cereais. Os aminoácidos Tyr, His e Trp também foram avaliados durante o procedimento de validação, uma vez que são passíveis de serem detectados nas amostras. Os procedimentos de desempenho do método foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais propostos pelo protocolo do EURACHEM(1998), sendo avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, efeito do dia, efeito de matriz, exatidão, precisão, LD e LQ. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos (THOMPSON et al., 2002; SOUZA

& JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas no comércio local da cidade de Florianópolis, SC. Foram analisados 5 tipos de cereais, produzidos por quatro fabricantes nacionais. As amostras foram moídas, tamisadas em peneira de malha de 0,25 mm e armazenadas em frascos herméticos ao abrigo da luz até sua utilização. A tomada de amostra para o procedimento de hidrólise foi realizada criteriosamente e de forma homogênea, devido à tendência dos grãos de açúcar se depositarem no fundo das embalagens.

O Quadro 1 mostra a composição dos cereais analisados e suas respectivas denominações utilizadas durante a discussão dos resultados.

Quadro 1 - Composição dos cereais utilizados nos experimentos.

AMOSTRA	INGREDIENTES
<p style="text-align: center;">A</p> <p>Cereal à base de trigo integral, arroz e milho.</p>	<p>Trigo integral, arroz, milho, açúcar, farelo de trigo, sal, extrato de malte, sais minerais e vitaminas, xarope de glicose, estabilizantes mono e diglicerídeos de ácidos graxos e fosfato trissódico, agente de firmeza fosfato tricálcio e antioxidante tocoferol.*</p>
<p style="text-align: center;">B</p> <p>Cereal à base de <i>flakes</i>, maltes e passas.</p>	<p>Aveia integral laminada, malte de cereais, flocos de cereais sem açúcar, flocos de milho sem açúcar, flocos de arroz sem açúcar, fibra de trigo, uvas passas, óleo de milho, aroma idêntico ao natural de baunilha. Contém glúten.</p>
<p style="text-align: center;">C</p> <p>Cereal à base de farinha de trigo.</p>	<p>Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, açúcar, leite em pó integral, vitaminas e minerais, sal e aromatizante. Contém glúten.</p>

Continua

Continuação

AMOSTRA	INGREDIENTES
<p style="text-align: center;">D</p> <p style="text-align: center;">Granola <i>diet</i></p>	<p>Aveia em flocos, maltitol, fibra e gérmen de trigo, mix de flocos (trigo, arroz, aveia, milho e cevada), uva passa, flocos de milho, castanhas (caju e pará), maltodextrina, óleo vegetal, maçã desidratada, gergelim, goma acácia, aromas naturais. Contém glúten. Pode conter traços de soja.</p>
<p style="text-align: center;">E</p> <p style="text-align: center;">Cereal à base de trigo</p>	<p>Farelo de trigo, açúcar, extrato de malte, sal, difosfato de cálcio di-hidratado, ácido ascórbico, niacinamida, ferro reduzido, óxido de zinco, cloridrato de piridoxina, riboflavina, mononitrato de tiamina, palmitato de retinol, ácido fólico, cobalamina.</p>

NOTA: Informações de composição fornecidas pelo fabricante. Fonte: o próprio autor. *Contém Glúten. Contém traços de leite.

3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Padrões dos L-aminoácidos Phe (>99%), Tyr (98%), His (>99%), e Trp (>99%) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.) foram utilizados como padrões analíticos de alto grau de pureza, durante as análises, pois, apesar deste trabalho contemplar a determinação de fenilalanina, os outros aminoácidos supracitados poderiam causar interferência no método desenvolvido utilizando CE, e,

portanto foi de grande importância para avaliação da seletividade e especificidade da metodologia proposta.

Outros reagentes utilizados durante os experimentos: NaOH PA, HCl PA (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); H_3PO_4 (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ácido 3,5 dinitrobenzóico e metanol (99,9%) (Sigma Aldrich, St. Louis, CO, E.U.A.); e dodecilsulfato de sódio (SDS) adquirido da Bio Agency Laboratórios (São Paulo, SP, Brasil).

3.3 SOLUÇÕES

As soluções estoque de Phe, Tyr, His e Trp foram preparadas isoladamente pela dissolução de $10 \pm 0,8$ mg do padrão em 10 mL de água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Nas soluções de histidina e tirosina foi necessário acidificar o meio para um aumento da solubilidade desses compostos. Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, até o momento do ensaio, e preparadas de acordo com a necessidade de cada procedimento experimental.

Padrão de ácido 3,5 dinitrobenzóico foi utilizado como padrão interno. A concentração da solução estoque foi de 1000 mg L^{-1} , preparada em metanol. Nas soluções padrões e amostras a serem analisadas a concentração final e constante do padrão interno foi de 25 mg L^{-1} .

O preparo dos eletrólitos de corridas utilizados, tanto durante os planejamentos fatoriais quanto para a condição definitiva de separação,

foram preparados a partir de soluções estoque de H_3PO_4 100 mmol L^{-1} e SDS 400 mmol L^{-1} .

Solução de NaOH 1 mol L^{-1} e 50% foram utilizados para o condicionamento inicial do capilar utilizado no equipamento de eletroforese capilar e para a destilação das proteínas pelo método Kjeldahl, respectivamente, sem a necessidade de padronização dessas soluções.

Solução de HCl 5,7 mol L^{-1} foi utilizada para a hidrólise ácida durante o preparo das amostras.

3.4 HIDRÓLISE ÁCIDA

As amostras de cereais foram submetidas à hidrólise de acordo com metodologia proposta por Carreira et al. (2009) adaptado. Para os experimentos foram pesados em balança analítica eletrônica $0,5 \pm 0,1$ g das amostras em tubos de borossilicato de 0,5 cm de diâmetro com tampa, e submetidas a vapor ácido (HCl 5,7 mol L^{-1}) para liberação dos aminoácidos. Os frascos foram fechados e levados para hidrólise à 110°C em estufa com controle de temperatura, por 24 h. O material presente nos tubos foi transferido para balão de vidro com capacidade para 25 mL e reconstituído com água desionizada. Alíquotas de 10 mL das amostras hidrolisadas, devidamente homogeneizadas e sonicadas, foram transferidas para tubos plásticos tipo *falcon* com capacidade para 15 mL e centrifugadas a 4 000 rpm. Desta solução hidrolisada foi retirada uma alíquota que foi diluída (1:4, v/v) com uma solução aquosa

contendo o padrão interno na concentração final de 25 mg L⁻¹ e submetidas à análise no equipamento de eletroforese capilar.

3.5 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.5.1 Eletroforese capilar

Os procedimentos analíticos foram realizados em equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo Agilent 7100 (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array*) e sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar. O *software* (HP ChemStation, rev A.06.01) foi utilizado para tratamento e aquisição de dados.

3.5.2 Condição experimental

Os capilares utilizados são de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poliimida, com 50 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de aproximadamente 940 mbar, foram realizadas diariamente com 15 min de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹, 15 min de água desionizada e 15 min de eletrólito de corrida. No intervalo entre corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 60 segundos com eletrólito de corrida, e no término das análises 10 min de hidróxido de sódio e 10 min água foram suficientes para a limpeza do capilar, armazenado com as extremidades imersas em água desionizada.

A injeção das soluções padrão e amostras foram realizadas pelo *outlet* (extremidade do capilar mais próxima do detector), injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar por 3 segundos. A separação dos analitos transcorreu com tensão aplicada de 20 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção, em tempo inferior a 2,5 minutos. O monitoramento dos sinais e do espectro no UV foi efetuado em 200 nm. A aquisição e tratamento dos eletroferogramas foram realizados pelo *software* HP Chemstation.

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente para as análises, e constituído por 30 mmol L⁻¹ de H₃PO₄, 100 mmol L⁻¹ de SDS e 25% de metanol.

3.5.3 Método comparativo usando LC-MS/MS

As amostras de cereais foram preparadas conforme descrito anteriormente e antes da injeção no LC-MS/MS foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm (Millex, Milipore, São Paulo, SP, Brasil) e diluídas com água desionizada (amostras injetadas com fator de diluição de 100 vezes). As amostras foram preparadas em triplicata e injetadas em duplicata. O método usando LC-MS/MS foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 Series da marca Agilent Technologies (Germany). As separações foram feitas utilizando uma coluna SeQuantTM ZIC[®]-HILIC (150 mm de comprimento; 2,1 mm de diâmetro interno; 3,5 µm de tamanho de partícula) da marca Merck (Darmstadt, Germany). A separação dos aminoácidos foi feita no modo gradiente usando os solventes A (metanol 95%:5% água) e B (água + ácido fórmico 0,1%) de acordo com as seguintes etapas: 0 min - 70%

solvente A, 9 min - 40% solvente A (gradiente linear), 13 min - 70% solvente A (gradiente linear). Condicionamento antes da injeção 4 min (solvente A 70%). A vazão da fase móvel foi de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. O volume de injeção das amostras e padrões foi 2 μL . A temperatura da coluna foi fixada em 30 $^{\circ}\text{C}$. O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e íon trap linear, modelo Q Trap 3200 da Applied Biosystems (Concord, Canada). O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para controlar o LC-MS/MS e fazer o tratamento dos dados obtidos nas análises. Os experimentos foram realizados usando a fonte TurboIonSprayTM (electrospray-ESI) no modo íon positivo. A agulha do capilar foi mantida a 5500 V. Alguns dos parâmetros do espectrômetro de massas: *curtain gas*, 10 psi; temperatura, 350 $^{\circ}\text{C}$; gas 1, 45 psi; gas 2, 45 psi; gás da dissociação induzida por colisão (CAD, do inglês “*Collisionally Activated Dissociation*”), médio. Outros parâmetros para o cone e energia da célula de colisão estão listados na Tabela 3.1. Os aminoácidos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”). A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de solução aquosa contendo os analitos de interesse.

Tabela 3.1 - Parâmetros do espectrômetro de massas.

Parâmetro	Aminoácidos			
	Phe	Tyr	Trp	His
íon precursor (m/z)	166,14	182,15	205,16	156,10
íon quantitativo	120,10	136,10	146,10	110,10
DP*	21,0	21,0	16,0	21,0
EP*	5,0	5,0	6,5	8,0
CEP*	10,0	10,0	12,0	10,0
CE*	15,0	15,0	19,0	17,0
CXP*	4,0	4,0	4,0	4,0

* DP- Declustering Potential; EP- Entrance Potential; CEP- Collision Cell Entrance Potential; CE- Collision Energy; CXP- Collision Cell Exit Potential.
Fonte: o próprio autor.

3.6 OUTROS EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E PROGRAMAS UTILIZADOS

Foram utilizados sonificador da marca Unique, modelo Ultra Cleaner 1400A (São Paulo, SP, Brasil); centrífugas da marca Centribio (São Paulo, SP, Brasil) e Fanem (modelo Excelsa 3, São Paulo, SP, Brasil), estufa de esterilização e secagem modelo SP400 (Labor, São

Paulo, SP, Brasil), destilador de nitrogênio modelo TE-036/1 (Tecnal, São Paulo, SP, Brasil), bloco digestor modelo TE-8150 (Tecnal, São Paulo, SP, Brasil), balança analítica AB204-SRS (Mettler Toledo, São Paulo, SP, Brasil) e micropipetas de volume variável da marca Labmate (São Paulo, Brasil).

Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 250 mL, tubos plásticos com capacidade para 15 mL; tubos de borossilicato com 0,5 cm de D.I., seringas plásticas, filtros de membrana 0,45 μm também foram utilizados.

Para o tratamento estatístico foram utilizados os programas: Excel 2007, Minitab 15 e Statistica.

3.7 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A umidade foi determinada de acordo com o método gravimétrico descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2005), por secagem em estufa a 105 °C durante 4 horas.

3.8 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO KJELDAHL

A determinação da concentração de nitrogênio total foi realizada de acordo o método de Kjeldahl modificado (AOAC, 991.20, 1995) e o resultado multiplicado pelo fator de conversão (Fc) nitrogênio: proteína, estabelecido pela Legislação Brasileira (Resolução RDC n. 360 de 23 de dezembro de 2003), para o cereal analisado (ANVISA, 2003).

3.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os procedimentos de desempenho do método foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais propostos pelo protocolo do EURACHEM (1998).

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeito do dia, efeito de matriz, exatidão, precisão, LD e LQ, foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, soluções eletrolíticas e amostras adicionadas dos padrões de L-aminoácidos. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos (THOMPSON et al., 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

3.9.1 Linearidade

As soluções estoque (SE_1) dos quatro L-aminoácidos foram preparadas independentes pesando-se $10,0 \pm 0,8$ mg em balão volumétrico de 10 mL, e a dissolução de cada padrão sólido foi em água. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a 4 °C.

Devido o alto custo dos padrões e a quantidade disponível, as soluções utilizadas na curva de calibração foram preparadas a partir das mesmas soluções estoque (SE_1), portanto foram preparadas sete soluções estoque (SE_2) para a construção da curva de calibração. Ao total, foram 7 preparações para cada uma dos sete níveis da curva de

calibração que foram injetados aleatoriamente, para minimizar possíveis erros. As soluções citadas aqui foram utilizadas somente para a construção das curvas de calibração, as utilizadas para o estudo de efeito de matriz e recuperação foram preparadas no dia do respectivo experimento. As faixas de concentração das soluções nos *pools* da curva de calibração estão indicadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Concentrações das curvas de calibração.

L-aa	Concentrações (mg L⁻¹)						
Trp	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5
Phe	10,1	15,2	20,2	25,2	30,3	35,4	40,4
His	10,8	16,2	21,6	27,0	32,4	37,8	43,2
Tyr	2,6	5,3	8,0	10,6	13,2	15,9	18,6

Fonte: o próprio autor.

Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aplicado ao modelo $Y_i = a + bX_i$, em que Y_i representa a razão das áreas analito/padrão interno, X_i as concentrações dos padrões dos analitos, a e b estimativas dos parâmetros da equação. Foram construídos gráficos de resíduos da regressão ($Y_i = a + bX_i$) para investigação de heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os *outliers* são pontos extremos que poderiam influenciar na regressão, e foram diagnosticados pelo teste de Grubbs,

que foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até a exclusão máxima de 22,2% de resultados. Foram verificadas premissas de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), homoscedasticidade (teste de Bartlett), independência dos resíduos (teste de Durbin-Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (testes F de Snedecor).

3.9.2 Efeito de matriz

Devido a falta de disponibilidade de uma matriz isenta dos aminoácidos em estudo, o efeito de matriz foi avaliado a partir da construção de curvas de calibração preparadas em uma solução contendo a mesma concentração final de HCl das amostras (aproximadamente $0,2 \text{ mol L}^{-1}$), como uma forma de mimetizar a matriz após o procedimento de hidrólise ácida, essa mesma solução foi denominada “solução eletrolítica”. As concentrações foram as mesmas indicadas para a curva em solvente na Tabela 3.2. Foram analisadas 7 réplicas dos 7 níveis e injetadas aleatoriamente. Os parâmetros das curvas em solução eletrolítica foram estimados de forma similar ao da faixa linear.

3.9.3 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos dos aminoácidos obtidos em eletroferogramas de soluções padrão e amostra, com auxílio do detector DAD. Foram analisadas amostras adicionadas de padrão e amostras brancas, além da

avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Foram observadas as resoluções dos picos das substâncias, a capacidade do método de detectar e quantificar todos os L-aminoácidos testados e a ausência de interferentes nos tempos de migração dos analitos estudados (INMETRO, 2010).

3.9.4 Precisão

A precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram determinadas para todos os níveis de concentração da curva em solvente para os L-aminoácidos, e cada nível foi preparado em 10 réplicas de soluções independentes de padrões e injetados aleatoriamente. Foram avaliados o desvio padrão relativo para a razão área do pico (padrão/padrão interno) e para a razão tempo de migração (padrão/padrão interno).

3.9.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaio de recuperação em que quantidades conhecidas de cada L-aminoácido foram preparados em HCl $5,7 \text{ mol L}^{-1}$ e adicionadas as matrizes antes da hidrólise. As concentrações adicionadas nas matrizes para cada nível estão indicadas na Tabela 3.3 e estão dentro da faixa linear estudada.

Tabela 3.3 - Concentrações adicionadas de L-aminoácidos nas matrizes.

L-aa	Concentrações (mg L⁻¹)					
Trp	0,53	1,22	2,33	2,91	8,15	12,22
Phe	1,22	2,82	5,39	6,73	18,85	28,27
His	1,31	3,02	5,75	7,19	20,11	30,16
Tyr	0,57	1,31	2,50	3,12	8,74	13,11

Fonte: o próprio autor.

Os seis níveis de recuperação foram preparados em triplicata e injetados em triplicata de forma aleatória. A percentagem de recuperação e o desvio padrão foram determinados para cada nível.

Também foi realizado um método comparativo, utilizando LC-MS/MS e realizado teste *t* para avaliar a exatidão das quantificações das amostras para os L-aminoácidos no método desenvolvido e por LC-MS/MS.

3.9.6 Limites de detecção e quantificação

Concentrações dos analitos dos pontos mais baixos da curva foram diluídos até que o LD fosse detectado pela relação sinal da razão do analito/ruído maior que 3. O LD do método foi estabelecido como a menor concentração detectada dos analitos em solventes, mas não necessariamente quantificada. O LQ foi estabelecido através da relação

sinal da razão do analito/ruído maior que 10. O LQ é a menor concentração na qual o método pode operar com exatidão e precisão aceitáveis.

Foram preparadas 10 réplicas independentes para cada analito e avaliado a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo para os LD e LQ.

3.9.7 Robustez

Para determinar a robustez do método analítico, o teste de Youden foi aplicado. Sete parâmetros analíticos foram selecionados para avaliação e oito ensaios foram realizados para determinar a influência dos mesmos no resultado final.

Os ensaios são realizados com as condições analíticas em seu valor nominal (representado por letras maiúsculas) e com uma pequena variação (letras minúsculas).

Para os sete parâmetros analíticos estabelecidos para avaliação da robustez do método foram determinados: quantificação; tempo de migração; resolução; simetria; e número de pratos dos L-aminoácidos. Os parâmetros e variações estão representados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez pelo teste de Youden para o método eletroforético proposto

	Parâmetro	Nominal	Variação
A/a	Tensão (kV)	20	17,5
B/b	pH	1,9	2,0
C/c	Temperatura (°C)	25	22,5
D/d	Pressão (mbar)	50	55
E/e	Comprimento de onda (nm)	200	205
F/f	Pré-condicionamento (s)	60	90
G/g	Tempo injeção (s)	3	4

Fonte: o próprio autor.

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito corridas eletroforéticas realizados em ordem aleatória. Dos ensaios realizados, quatro deles foram executados com cada parâmetro em seu valor nominal e quatro deles com o parâmetro com variação. A Tabela 3.5 demonstra a série de combinações do planejamento fatorial para os parâmetros avaliados no teste de Youden. Os resultados das análises são representados por letras de *s* a *z*.

Tabela 3.5 – Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão (kV)	A	A	A	A	a	a	a	a
pH	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura (°C)	C	c	C	c	C	c	C	c
Pressão (mbar)	D	D	d	d	d	d	D	D
Comprimento de onda (nm)	E	e	E	e	e	E	e	E
Pré-condicionamento (s)	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo injeção (s)	G	g	g	G	G	G	G	g
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: (CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A., 2009)

Em cada combinação, foram realizadas três injeções da solução da amostra E (Quadro I) e três da solução padrão dos aminoácidos na concentração intermediária da curva. Após alterações do pH de trabalho o capilar foi pré-condicionado como no início de um dia de trabalho.

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, foram comparadas as médias dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas. Por exemplo, para avaliar o efeito de tensão no resultado final da análise, foi utilizada a seguinte Equação:

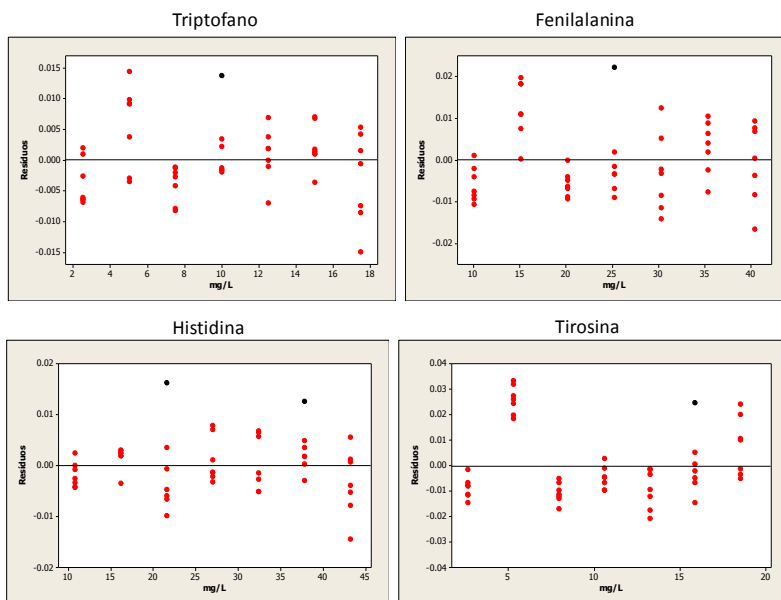
$$\text{Efeito A/a} = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LINEARIDADE

Os valores extremos da regressão dos resíduos foram confirmados pelo teste de Grubbs para $\alpha=0,05$. Os gráficos dos resíduos da regressão estão apresentados na Figura 3.1, onde os valores extremos foram identificados com coloração preta e retirados.

Figura 3.1- Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em água, com indicação dos respectivos *outliers*



Fonte: o próprio autor.

Foi identificado apenas um valor extremo de resíduo para cada curva do triptofano, fenilalanina e tirosina, enquanto que para a histidina, foram identificados dois valores extremos. Todos estes valores foram retirados, obedecendo ao limite de exclusão de 22,2%. Não foram observadas tendências pelo método de inspeção visual para nenhuma das curvas após a retirada dos valores extremos.

A distribuição normal dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para $\alpha=0,05$. Foram encontrados valores de 0,128; 0,124; 0,115 e 0,128 para o triptofano, fenilalanina, histidina e tirosina, respectivamente. Os valores do desvio da normalidade não são significativos, pois de acordo com a tabela de valores críticos, para $n=50$, $p < 0,19$.

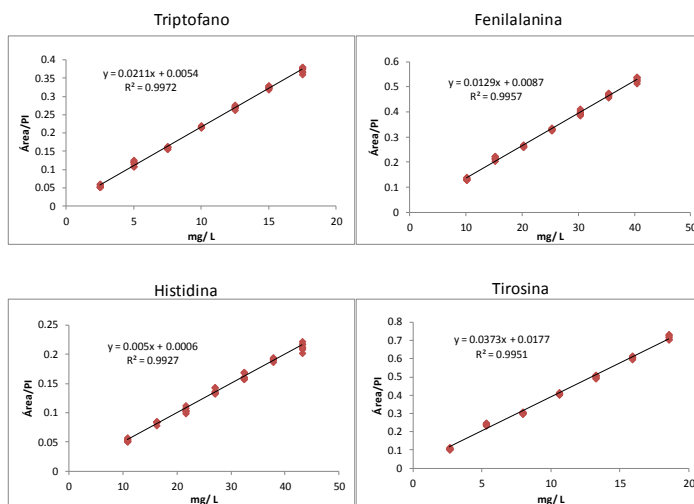
A distribuição dos resíduos da regressão foi homogênea ao longo dos níveis para todas as curvas, demonstrando homoscedasticidade, pois o teste de Bartlett não foi significativo ($p>0,05$). Os valores estimados para o triptofano foi de 0,076; para a fenilalanina 0,078, para a histidina 0,099 e para a tirosina foi de 0,089.

Houve independência dos resíduos da regressão para as curvas do triptofano, fenilalanina e histidina e dependência para a curva da tirosina, uma vez que a estatística de Durbin-Watson calculada foi de 1,81; 1,55; 1,61 e 0,89, respectivamente. Estas afirmativas foram comprovadas através dos valores críticos tabelados de Durbin-Watson para $n=50$, onde $d_L= 1,50$ e $d_U= 1,59$; o qual estabelece que para que haja independência dos resíduos, estes valores devem estar de acordo com o teste, onde $d_U < d_w < 4-d_U$ (DURBIN-WATSON, 1951).

As premissas de que os resíduos da regressão seguem uma distribuição normal, são homoscedásticos e independentes foram confirmados para as curvas do triptofano, fenilalanina e histidina, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F , além do emprego adequado do MMQO sem ponderações. Já como a curva da tirosina, mostrou dependência, ou seja, uma autocorrelação, estes resultados podem subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança, portanto estudos mais aprofundados devem ser tomados para o ajuste da função (JUNKEIRA; SOUZA; GINN, 2005).

As curvas de calibração para os quatro aminoácidos após a retirada dos *outliers*, com as respectivas equações da reta e coeficiente de determinação, estão ilustrados na Figura 3.2.

Figura 3.2– Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em solventes, com indicação de cor preta dos respectivos *outliers*

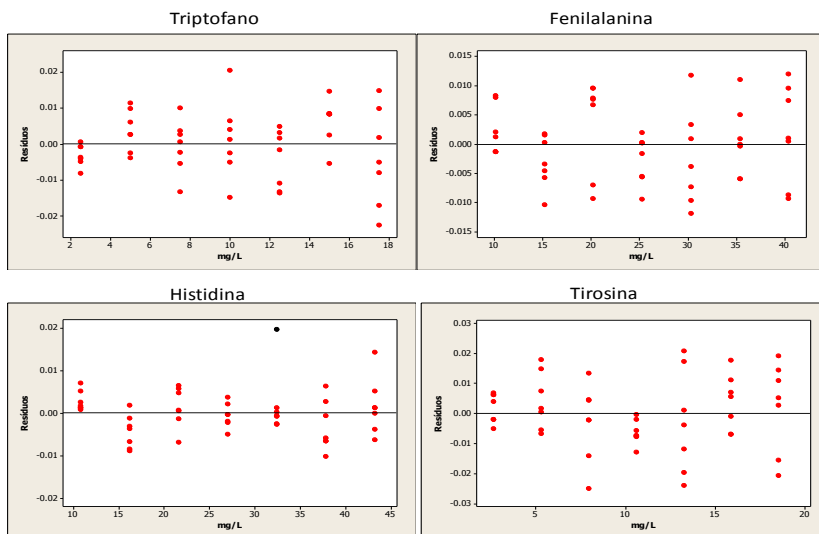


Fonte: o próprio autor.

4.2 EFEITO DE MATRIZ

Como descrito anteriormente, para a linearidade foram avaliadas as premissas relativas ao MMQO para as curvas dos analitos, agora em uma solução eletrolítica. Os valores extremos da regressão dos resíduos foram detectados e retirados, conforme Figura 3.3. Foram confirmados que os resíduos de regressão seguem a distribuição normal, com valores de 0,121; 0,120; 0,115 e 0,117 para o triptofano, fenilalanina, histidina e tirosina, respectivamente. O teste de Bartlett não foi significativo ($p > 0,05$) para as curvas de fenilalanina e de histidina com valores encontrados de 0,316 e 0,376, demonstrando homoscedasticidade. Já para o triptofano e para a tirosina foram encontrados valores de $p < 0,05$ significativos (0,033 e 0,013, respectivamente), ou seja, são heteroscedásticos. Já todas as curvas dos aminoácidos em solução eletrolítica apresentaram dependência nos resíduos de regressão, uma vez que $0 \leq d_w \leq d_L$ e os valores calculados foram de 1,21 para o triptofano; 1,16 para a fenilalanina; 1,21 para a histidina e 1,35 para a tirosina. É interessante observar que a utilização apenas dos coeficientes de correlação ou determinação não é suficiente para avaliação precisa da linearidade do método, uma vez que os valores destes coeficientes foram elevados para todos os aminoácidos (superiores a 0,99), apesar de haver uma inadequação dos dados ao modelo.

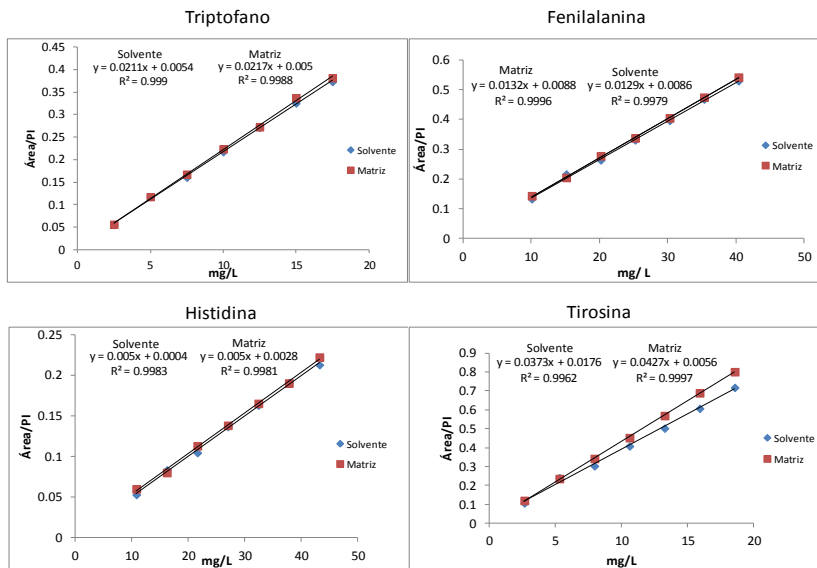
Figura 3.3– Gráficos dos resíduos da regressão das curvas dos aminoácidos em solução eletrolítica, com indicação de cor preta dos respectivos *outliers*.



Fonte: O próprio autor.

As curvas de calibração em solvente (água) e solução eletrolítica (matriz), com suas respectivas equações e coeficientes de determinação, estão apresentadas na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Curvas de calibração dos aminoácidos em solvente e em solução eletrolítica



Fonte: O próprio autor.

As comparações entre as curvas em água e em solução eletrolítica, apresentadas na Tabela 3.6, para as razões de área dos padrões pelo PI não apresentaram diferenças significativas, com $p > 0,05$ para todos os analitos. Quando comparado às inclinações e intersecções, $p > 0,05$ para as curvas do triptofano, fenilalanina e histidina, não possuindo estes, efeito de matriz. Fato que não foi observado para a tirosina, pois houve diferença significativa ($p < 0,05$), indicando um possível efeito de matriz para este aminoácido.

Tabela 3.6 – Comparações entre as inclinações e intersecções das curvas dos analitos em água e na solução eletrolítica.

Estatística	L-aa			
	Trp	Phe	His	Tyr
<i>F</i>	0,9474	0,9631	0,9760	0,7666
<i>p</i>	0,4747	0,4824	0,4886	0,3776
	Inclinação			
<i>F</i>	0,0957	0,2884	0,4236	0,0048
<i>p</i>	0,0873	0,2238	0,2975	0,0046
	Intersecção			
<i>F</i>	0,2155	0,3305	2,71	0,043
<i>p</i>	0,1773	0,2484	0,2698	0,021

p= significância, *F*= estatística F de Snedecor. Fonte: o próprio autor.

Mesmo os modelos lineares para as curvas em solução eletrolíticas serem inadequados, os resultados foram comparados a fim de verificar o efeito de matriz. Considerando que os resultados encontrados em soluções padrões em água não diferem das respostas obtidas na solução eletrolítica, podemos afirmar que não existe efeito de

matriz para o triptofano, fenilalanina e histidina, portanto, curvas com solventes foram utilizadas nas etapas subsequentes da validação e também por elas apresentarem funções da curva ajustadas ao modelo linear. As demais etapas de validação para as curvas de tirosina, foram realizadas na solução eletrolítica, bem como a quantificação das amostras.

4.3 SELETIVIDADE

Para se avaliar a seletividade do método, foi realizada adição de padrão nas matrizes para confirmar sua identidade através dos espectros de UV que são característicos para cada analito. Os analitos triptofano, histidina e tirosina foram incluídos nas análises, por serem possíveis interferentes presentes nas amostras.

Como todos os analitos tiveram boa resolução nas matrizes, sem interferentes nos tempos de migração de cada analito e seus espectros foram confirmados com o dos padrões, pode-se atestar uma boa seletividade do método.

4.4 RECUPERAÇÃO E EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação, no qual foram adicionadas concentrações conhecidas de padrões dos aminoácidos nas amostras antes das hidrólises. Os valores obtidos para estes ensaios encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Médias de recuperação aparente para os quatro aminoácidos nas cinco amostras em diferentes níveis de concentração

L-aa	Conc. (mg L ⁻¹)	Amostras (Recuperação %)				
		A	B	C	D	E
Trp	2,5	83,88 ± 6,16	71,37 ± 10,72	76,95 ± 2,60	87,73 ± 5,15	63,03 ± 3,84
	5	65,00 ± 9,03	59,70 ± 5,83	61,81 ± 1,86	74,63 ± 3,20	55,99 ± 5,31
	7,5	54,77 ± 3,82	49,29 ± 2,76	49,83 ± 1,35	59,84 ± 1,31	47,97 ± 3,66
	10	50,26 ± 4,92	53,91 ± 4,31	53,55 ± 2,19	57,41 ± 3,72	66,39 ± 4,85
	12,5	30,31 ± 1,93	36,95 ± 0,35	34,81 ± 1,08	41,42 ± 2,19	34,23 ± 3,06
	17,5	21,43 ± 1,24	26,02 ± 0,56	27,45 ± 1,98	29,85 ± 1,19	26,15 ± 1,27
Phe	10,1	89,97 ± 7,92	98,51 ± 7,41	98,51 ± 7,41	87,53 ± 4,96	92,64 ± 9,01
	15,2	89,87 ± 5,27	103,47 ± 2,99	103,47 ± 2,99	86,82 ± 3,97	103,88 ± 7,85
	20,2	94,69 ± 2,81	101,10 ± 4,30	101,10 ± 4,30	88,60 ± 0,63	97,44 ± 2,35
	25,2	91,18 ± 3,83	103,53 ± 6,89	103,53 ± 6,89	88,18 ± 2,37	96,11 ± 2,82
	30,3	95,71 ± 4,85	101,20 ± 3,42	101,20 ± 3,42	93,18 ± 2,49	97,99 ± 3,30

Continua

Continuação

L-aa	Conc. (mg L ⁻¹)	Amostras (Recuperação %)				
		A	B	C	D	E
	40,4	93,71 ± 1,97	93,66 ± 1,04	93,66 ± 1,04	88,60 ± 1,83	101,57 ± 1,63
	10,8	88,83 ± 6,41	80,37 ± 1,22	81,35 ± 1,98	96,30 ± 5,82	97,85 ± 0,23
	16,2	86,51 ± 5,51	83,79 ± 4,93	80,60 ± 1,55	92,83 ± 3,42	95,85 ± 7,56
His	21,6	94,27 ± 7,38	82,82 ± 1,86	91,81 ± 3,03	99,70 ± 4,19	101,06 ± 9,24
	27	88,46 ± 6,84	89,56 ± 6,54	85,65 ± 4,17	91,26 ± 4,55	97,21 ± 6,12
	32,4	88,68 ± 6,42	97,55 ± 10,48	90,99 ± 3,13	90,45 ± 5,04	97,30 ± ±3,72
	2,6	99,50 ± 4,29	89,35 ± 3,72	86,71 ± 2,14	97,34 ± 5,68	91,01 ± 6,17
	5,3	91,66 ± 3,35	83,97 ± 1,52	81,41 ± 1,36	91,61 ± 3,90	91,68 ± 5,89
Tyr	8,0	91,96 ± 3,56	95,61 ± 2,90	95,56 ± 3,71	87,83 ± 3,44	83,23 ± 2,78
	10,6	90,69 ± 3,87	93,91 ± 0,91	100,44 ± 3,15	85,48 ± 2,62	83,03 ± 2,81
	13,3	83,87 ± 3,98	93,83 ± 0,60	98,62 ± 1,76	95,14 ± 3,61	81,81 ± 1,59
	18,6	88,60 ± 1,09	84,67 ± 1,64	84,82 ± 3,57	86,81 ± 3,38	82,61 ± 2,31

Fonte: o próprio autor.

A média de recuperação aparente para os aminoácidos fenilalanina, histidina e tirosina nas amostras ficou dentro da faixa determinada pela EC (2002) para níveis $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ que é aceita na faixa de 80 a 110%. O desvio padrão não ultrapassou de 11, tendo seus valores maiores principalmente em níveis de concentrações mais baixos. O desvio padrão relativo não foi maior que 10% para nenhum nível, sinalizando uma exatidão para o método validado.

A avaliação da exatidão do método também foi realizada pela comparação do método otimizado por CE-UV com LC-MS/MS. Os resultados da quantificação pelos dois métodos estão indicados na Tabela 3.8 e os cromatogramas típicos obtidos pelo método estão apresentados na Figura 3.5.

Tabela 3.8 – Comparação do método proposto e LC-MS/MS.

Amostras	L-aa	EC*	LC-MS/MS*
	Trp	N.D.	N.D.
A	Phe	437,38 \pm 22,87	425,47 \pm 0,86
	His	264,48 \pm 26,17	302,20 \pm 7,40
	Tyr	104,08 \pm 2,42	102,42 \pm 0,85
	Trp	N.D.	N.D.
B	Phe	464,61 \pm 28,16	485,21 \pm 6,94
	His	332,64 \pm 27,01	316,90 \pm 7,51

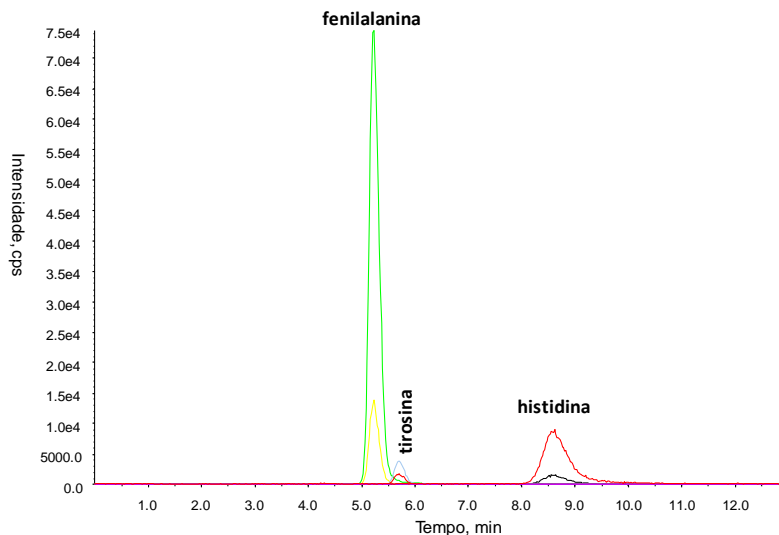
Continua

Continuação

Amostras	L-aa	EC*	LC-MS/MS*
	Tyr	124,36 ± 7,48	119,85 ± 0,9
	Trp	N.D.	N.D.
C	Phe	742,72 ± 42,29	768,91 ± 8,81
	His	577,01 ± 26,48	588,09 ± 5,60
	Tyr	269,63 ± 7,97	266,22±7,92
	Trp	N.D.	N.D.
D	Phe	486,97 ± 39,59	515,77±18,29
	His	300,03 ± 11,04	334,55 ± 11,68
	Tyr	181,58 ± 8,93	192,82 ± 7,04
	Trp	N.D.	N.D.
E	Phe	460,39 ± 14,63	432,91 ± 3,63
	His	459,95 ± 25,62	360,22 ± 0,31
	Tyr	141,21 ± 0,24	142,01 ± 0,32

* Concentração em mg 100 g⁻¹. Fonte: o próprio autor.

Figura 3.5 - Cromatograma de uma amostra (A) hidrolisada obtidos pelo método comparativo utilizando LC-MS/MS. O aminoácido Trp não foi detectado nessas condições.



Fonte: o próprio autor

O fato de o triptofano apresentar resultados baixos de recuperação, não é atribuído à falta de exatidão do método, e sim, pelo fato que ele é degradado durante a hidrólise ácida. Penke, Ferenczi e Kovács (1973) realizaram estudos de recuperação do triptofano com dois agentes de hidrólise em comparação a hidrólise ácida, e os resultados demonstraram níveis de recuperação de 94,5% e 95,4% quando utilizados ácido mercaptoetanosulfônico (3 N) e ácido *p*-toluenosulfônico (3 N)/0,2% de triptamina, respectivamente, em comparação com a recuperação de 79,7% para HCl 6 N/4% ácido

tioglicólico. Os autores constataram no mesmo estudo que a degradação do triptofano é mais pronunciada em amostras com altos teores de carboidrato, até mesmo quando utilizado ácido mercaptoetanossulfônico durante a hidrólise. Duen (1973) estudou o efeito de outros aminoácidos comumente presentes em alimentos como interferentes nos resultados baixos de recuperação para o triptofano. Aminoácidos foram adicionados isoladamente durante a hidrólise ácida convencional do triptofano. A hidrólise na presença de cistina causou uma perda substancial de triptofano com destruição parcial da cistina. Outros aminoácidos foram observados como interferentes: serina; hidroxiprolina e tirosina. Os autores propõem os possíveis mecanismos de degradação do triptofano e o efeito de alguns agentes de hidrólise para evitar essa perda.

Os resultados obtidos durante a análise por LC-MS/MS estão de acordo com estudo realizado por Simat e Steinhart (1998) que estudaram os produtos de degradação do triptofano após sua oxidação. Os resultados apontaram para a presença de 16 possíveis produtos de degradação, muitos desses apresentam semelhança estrutural ao triptofano e levando a crer que o espectro confirmado por CE que foi atribuído para este aminoácido, pertence a subprodutos da degradação do triptofano durante na hidrólise ácida. Por possuírem espectros semelhantes, foram identificados como sendo o triptofano. Após análise por LC-MS/MS ficou comprovado a total degradação do triptofano uma vez que o mesmo não foi detectado durante a análise.

Os resultados obtidos de quantificação dos aminoácidos nas amostras de cereais por CE-UV e LC-MS/MS demonstraram a partir de tratamento estatístico usando *test-t* pareado que os resultados são

estatisticamente iguais com nível de confiança de 95%, pois $t_{calc} < t_{crític}$ (amostra A $t_{calc} = 0,53$; amostra B $t_{calc} = 0,32$; amostra C $t_{calc} = 0,67$; amostra D $t_{calc} = 0,3$; $t_{calc} = 0,51$) para $t_{crític} = 12,71$ (N.G.L. = 2). Isso comprova associado aos outros parâmetros estudados para a validação analítica que o método mostrou-se com uma boa exatidão para os aminoácidos fenilalanina, histidina e tirosina.

4.5 PRECISÃO

A precisão intra-ensaio foi determinada por 70 (n=70) injeções consecutivas e aleatórias para cada curva dos analitos. Cada ponto (7 níveis) foi preparado em 10 réplicas de soluções independentes de padrões. Estes ensaios foram realizados no mesmo dia, com mesmo equipamento e mesmo analista. A avaliação inter-ensaio, seguiu os mesmos parâmetros da intra-ensaio, porém, foi realizada em dia diferente com outro analista. Ambas as precisões são mostradas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Precisão intra e inter- ensaios para os aminoácidos.

<i>Conc.</i> (mg L ⁻¹)	<i>L-aa</i>	Intra-ensaio (RSD*%)		Inter-ensaio (RSD%)	
		<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>	<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>
2,5	Trp	0,21	6,80	0,20	6,08
10,1	Phe	0,15	5,72	0,19	4,82
10,8	His	0,18	6,49	0,27	4,68
2,6	Tyr	0,06	6,58	0,07	5,41
5,0	Trp	0,10	4,65	0,17	4,00
15,2	Phe	0,61	4,17	0,07	1,14
16,2	His	0,08	6,22	0,13	5,22
10,6	Tyr	0,06	4,78	0,25	2,30
7,5	Trp	0,07	3,45	0,09	4,10
20,2	Phe	0,05	5,25	0,22	4,51
21,6	His	0,06	6,17	0,05	6,57
7,95	Tyr	0,12	4,41	0,07	2,35
10	Trp	0,36	2,75	0,35	2,75
25,2	Phe	0,15	2,22	0,15	2,22
27,0	His	0,14	4,11	0,14	4,12
10,6	Tyr	0,52	2,09	0,51	2,09

Continua

Continuação

<i>Conc.</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>L-aa</i>	Intra-ensaio (RSD*%)		Inter-ensaio (RSD%)	
		<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>	<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>
12,5	Trp	0,09	4,25	0,06	2,17
30,3	Phe	0,06	2,99	0,06	1,33
32,4	His	0,05	4,37	0,05	3,71
13,3	Tyr	0,08	3,36	0,03	1,59
15,0	Trp	0,13	3,57	0,11	1,79
35,4	Phe	0,11	2,47	0,07	1,84
37,8	His	0,08	2,91	0,08	4,68
15,9	Tyr	0,16	3,14	0,05	3,68
17,5	Trp	0,05	3,89	0,11	1,68
40,4	Phe	0,04	2,72	0,10	1,59
43,2	His	0,04	3,95	0,32	4,71
18,6	Tyr	0,05	2,93	0,08	1,18

*RSD, desvio padrão relativo (do inglês *relative standard deviation*). Fonte: o próprio autor.

Para a medida da precisão intra-ensaio, o desvio padrão relativo foi inferior a 6,80% para a razão área dos picos; e para tempo de migração, o RSD% foi inferior a 0,61%. Para a precisão inter-ensaio, valores inferiores de 6,57% e 0,51% para a razão área dos picos e tempo

de migração foram encontrados, respectivamente. Para estes parâmetros, os valores reportados em literatura para o desvio padrão relativo, foram inferiores de 6,6% para razão da área do pico e 1% para o tempo de migração (JIANG *et al.* 2009; SOGA e ROSS 1999; CHOU *et al.* 1998; KLAMPF 1999; TAVARES e FUJIYA 2003; SEGURA-CARRETERO *et al.* 2004; OGURI; YOKOI e MOTOHASE,1997).

4.6 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção e quantificação dos analitos estudados foram determinados através da adição de padrão em solvente, visto que não há existência de matrizes isentas destes analitos. Os valores de LD foram determinados por 10 réplicas independentes pela relação sinal do padrão adicionado/ruído ≥ 3 . E os limites de quantificação foram avaliados com os mesmos critérios que os utilizados para o LD, porém, o sinal do padrão adicionado/ruído é maior que 10. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Limites de detecção e quantificação para os analitos.

L-aa	LD (mg L ⁻¹)	RSD%	LQ (mg L ⁻¹)	RSD%
Trp	0,5	8,56	1,75	4,06
Phe	1,0	6,22	3,0	7,42
His	2,5	7,64	7,0	6,2
Tyr	0,25	6,04	1,0	8,42

*RSD, desvio padrão relativo (do inglês *relative standard deviation*). Fonte: o próprio autor.

Os valores de desvio padrão relativo, são aceitáveis, pois estão todos abaixo de 10%, que é o limite considerado ideal para eletroforese capilar. Para a aplicabilidade do método, estes valores são adequados, tendo em vista que as amostras encontram-se acima destes valores. Os limites de detecção estão próximos de alguns métodos reportados na literatura e são até mais baixos do que em outros métodos, que para a fenilalanina variam de 0,5 - 8,6 mg L⁻¹ (SOGA e ROSS 1999; KLAMPF 1999; LEWIS et al. 2010; SEGURA-CARRETERO *et al.* 2004; OGURI; YOKOI e MOTOHASE,1997).

4.7 ROBUSTEZ

A robustez do método de quantificação para os quatro aminoácidos foi avaliada pelo teste de Youden. A influência de sete parâmetros analíticos, em relação ao tempo de migração, número de pratos, resolução, simetria e concentração dos aminoácidos foi avaliada em oito combinações de experimentos.

Para avaliar o efeito de cada parâmetro, a média dos quatro valores nominais foram subtraídos da média dos quatro valores correspondentes as variações. Os resultados das equações aplicadas aos sete parâmetros avaliados estão representados na Tabela 3.11, 3.12, 3.13 e 3.14.

Tabela 3.11 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para o triptofano.

Efeito	Concentração*	t_m (min)	Simetria	N	Resolução
Tensão (kV) (A= 20; a=17,5)	97,6565-68,3449 = 29,3117	1,4832-1,7120 = -0,2288	1,2872-1,2014 = 0,0808	78242-76100 = 2142	4,7844-4,4916 = 0,2928
pH (B=1,9; b=2,1)	66,6583-98,3431 = -38,6847	1,5894-1,6078 = -0,0183	1,1891-1,3049 = -0,1158	77206-75137 = 2069	4,7121-4,5639 = 0,1481
Temperatura (°C) (C=25; c=22,5)	90,3221-73,6793 = 14,6428	1,5529-1,6443 = -0,0913	1,2619-1,2321 = - 0,1158	70002-71341 = - 1339	4,7289-4,5471 = 0,1817
Pressão (mbar) (D=50; d=55)	90,8088-73,1925 = 15,6163	1,5909-1,6063 = -0,0153	1,1186-1,3754 = -0,2568	78311-76031 = 2280	4,7199-4,5560 = 0,1639
Com graminho de onda (nm) (E=200; e=205)	126,8007-39,2007 = 87,5990	1,5529-1,6443 = -0,0913	1,2228-1,2713 = -0,0485	70002-72341 = - 2339	4,6590-4,6170 = 0,0419
Pré-condicionamento (s) (F= 60; F=90)	95,6910-70,3104 =25,3807	1,6-1,5972 = 0,0028	1,2677-1,2263 = 0,0413	68450-70892 = - 2442	4,6107-4,6653 = -0,0546
Tempo injeção (s) (G=3; g=4)	95,3266-71,0023 = 24,3242	1,6005-1,5967 = 0,0038	1,2292-1,2648 = -0,0957	71574-72768 = 1194	4,8016-4,4744 = 0,3272

*Concentração em μg 100 μl . Fonte: o próprio autor

Tabela 3.12 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a fenilalanina.

Efeito	Concentração*	t _m (min)	Simetria	N	Resolução
Tensão (kV) (A=20; s=17,5)	456,8377-438,1720 = 18,6657	1,6719-1,9231 = -0,2512	1,7219-1,3722 = 0,3498	49721-48568 = 1153	2,6971-2,4560 = 0,2362
pH (B= 1,9; b=2,1)	423,4326-471,5571 = -48,1045	1,7815-1,8135 = - 0,0183	1,3503-1,7438 = -0,3934	53247-53043 = 204	2,6807-2,4674 = 0,2133
Temperatura (°C) (C= 15; c= 22,5)	479,2480-413,7617 = 65,48	1,7497-1,8459 = -0,0957	1,3775-1,7166 = -0,3391	49696-48594 = 1102	2,6925-2,4535 = 0,2370
Pressão (mbar) (D=50; d=55)	443,5818-446,4230 = 2,1338	1,7904-1,8046 = -0,0142	1,3107-1,7834 = -0,4728	48808-49482 = -674	2,5805-2,5676 = 0,0129
Comprimento de onda (nm) (E=100; e=105)	470,4576-424,5521 = 45,9055	1,7497-1,8453 = -0,0957	1,5025-1,5916 = -0,0891	49696-48594 = - 1102	2,6457-2,5024 = 0,1454
Pre-condicionamento (é) (F= 60; f=90)	436,3605-458,6492 = - 22,2886	1,7995-1,7955 = 0,0040	1,6704-1,4237 = 0,2468	48733-48537 = - 784	2,6045-2,5436 = 0,0623
Tempo injeção (é) (G=3; g=4)	429,4834-445,6547 = -19,17	1,7981-1,7960 = 0,0012	1,2392- 1,2648 = -0,0357	71574 -72768 = 1194	4,8016-4,4744 = 0,3272

*C: concentração em mg 100 g⁻¹. Fonte: o próprio autor.

Tabela 3.13 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a histidina.

Efeito	Concentração*	t_m (min)	Simetria	N	Resolução
Tensão (kV) (A=20, $\sigma=17,5$)	408,6524-399,8724 = 15,7800	1,7873-2,0471 = -0,2598	1,5350-1,5825 = -0,0475	50089-48375 = 1714	5,1759-5,2611 = -0,0851
pH (B=1,9, b=2,1)	395,1625-408,3622 = -13,1998	1,9012-1,9333 = -0,0321	1,59-1,5875 = -0,0575	50098-48365 = 1732	50098-48365 = 1732
Temperatura (°C) (C=23, $\sigma=22,5$)	413,0693-390,4614 = 22,6019	1,8710-1,9694 = -0,0924	1,5267-1,5908 = -0,0642	49006-49458 = 451	49006-49458 = 451
Pressão (atmbar) (D=50, $d=55$)	431,4675-372,0672 = 59,4103	1,9101-1,9243 = -0,0142	1,5098-1,6137 = -0,1098	48951-49513 = -562	48951-49513 = -562
Comprimento de onda (nm) (E=200, $\sigma=20,5$)	423,5389-379,9658 = 43,5932	1,8710-1,9694 = -0,0924	1,5490-1,5685 = -0,0195	49016-49778 = -762	49016-49778 = -762
Pré-condicionamento (s) (F= 60, f=90)	408,4457-395,0790 = 13,3667	1,9198-1,9147 = 0,0051	1,5420-1,5755 = -0,0335	50432-48031 = 2401	50432-48031 = 2401
Tempo injeção (s) (G=3, g=4)	409,6524-393,8724 = 15,7800	1,7873-2,0471 = -0,2598	1,5350-1,5825 = -0,0475	50089-48375 = 1714	5,1759-5,2611 = -0,0851

*Concentração em mg 100 g⁻¹. Fonte: o próprio autor.

Tabela 3.14 – Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação, tempo de migração, simetria, número de pratos, resolução do método para a tirosina.

Efeito	Concentração*	t_m (min)	Simetria	N	Resolução
Tensão (kV) (A= 20; a=17,5)	98,2979-70,7154 = 27,5225	2,0428-2,3367 = -0,2939	1,2631-1,2015 = -0,0616	30370-32976 = -2606	4,6640-4,9349 = -0,2710
pH (B=1,9; b=2,1)	69,8264-99,1269 = -29,3005	2,1671-2,2123 = -0,0453	1,1776-1,2870 = -0,1094	32921- 31424 = 1497	5,0547-4,5442 = 0,5104
Temperatura (°C) (C=25; c=22,5)	93,5584-75,3949 = 18,1634	2,1411-2,2383 = -0,0972	1,2086-1,2560 = -0,0474	30423-28922 = 1501	4,5223-5,0780 = -0,5530
Pressão (mbar) (D=50; d=55)	90,7533-78,1980 = 12,5574	2,1831-2,1963 = -0,0132	1,1639-1,2887 = -0,1528	34043-33304 = 738	4,8650-4,7359 = 0,1271
Comprimento de onda (nm) (E=300; e=205)	123,9667-44,9865 = 78,9802	2,1411-2,2383 = -0,0972	1,2439-1,2187 = 0,0273	29423-31423 = -1998	4,7803-4,8181 = -0,0373
Pré-condicionamento (s) (F= 60; f=90)	95,4462-73,5071 = 21,9390	2,1938-2,1857 = 0,0081	1,2404-1,2242 = 0,0162	31589-32756 = -1167	4,7784-4,8205 = -0,0421
Tempo injeção (s) (G=3; g=4)	92,3789-77,7463 = 14,6326	2,1914-2,1880 = 0,0084	1,2096-1,2550 = -0,0454	33217-32128 = 1088	4,9805-4,6684 = 0,2621

*Concentração em mg 100 gr⁻¹. Fonte: o próprio autor

De acordo com os valores apresentados nas Tabelas 3.11, 3.12, 3.13 e 3.14, foi possível observar que o método eletroforético se mostrou altamente robusto para os parâmetros analíticos de tempo de migração, resolução e simetria para os quatro aminoácidos.

As concentrações nas amostras variaram para todos os parâmetros entre os valores nominais e as variações do método, este fato se deve provavelmente a grande diferença de absorvidade dos analitos nos comprimentos de onda de 200nm e 205nm.

O número de pratos teóricos é um parâmetro que leva em consideração tanto o tempo de migração quanto o alargamento das bandas eletroforéticas, e elas estão diretamente relacionadas à absorvidade molar de cada analito (CÉSAR; PIANETTI,2009). Quando o comprimento de onda foi modificado para 205 nm, houve uma diminuição significativa das áreas do triptofano e tirosina, conseqüentemente, perderam detectabilidade, fato este que pode ser atribuído à diferença dos valores encontrados para o número de pratos teóricos para todos os parâmetros e analitos estudados.

Portanto, o método não foi robusto para os seguintes parâmetros retratados, e os estudos devem ser repetidos mantendo o comprimento de onda em 200 nm.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR

As amostras foram quantificadas em base seca e os resultados para os teores de umidade das amostras podem ser visualizados na Tabela 3.15.

Tabela 3.15 – Umidade relativa das amostras de cereais

.Amostra	% Umidade	DP	RSD (%)
A	3,3693	0,0417	1,2369
B	7,5639	0,0710	0,9392
C	3,7580	0,0199	0,5297
D	4,9162	0,0166	0,3382
E	4,3580	0,0199	0,4576

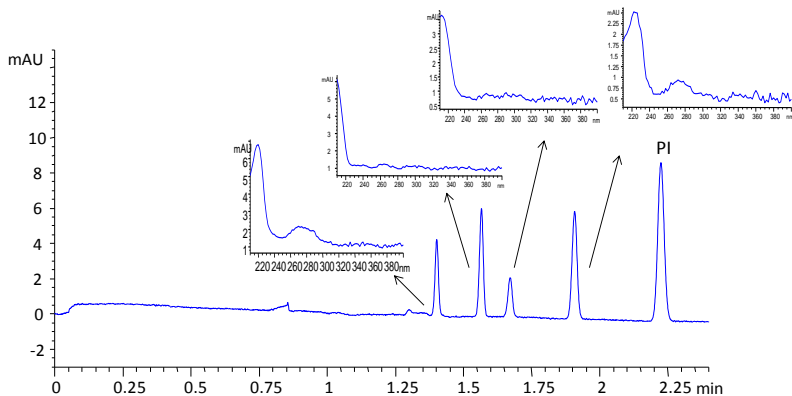
Fonte: o próprio autor.

Os resultados encontrados para os aminoácidos utilizando o método de eletroforese capilar estão apresentados na Tabela 3.17. E os eletroferogramas para os padrões dos aminoácidos e para cada amostra estão apresentados nas Figuras 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12.

Tabela 3.16 – Concentrações dos aminoácidos em base seca.

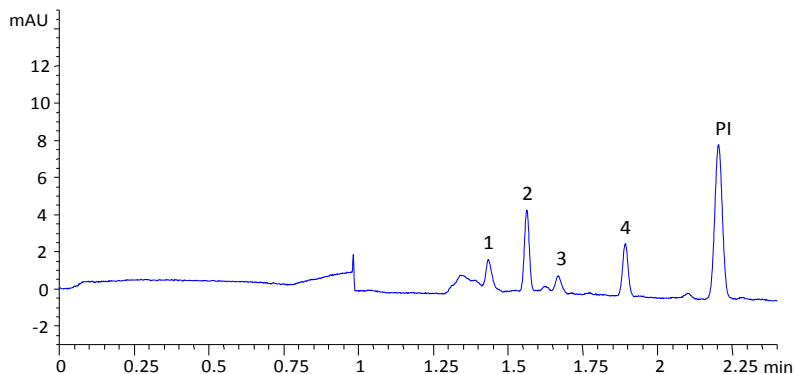
Amostra	Trp*	Phe*	His*	Tyr*
A	N.D.	437,38 ± 22,87	264,48 ± 26,17	104,08 ± 2,42
B	N.D.	464,61 ± 28,16	332,64 ± 27,01	124,36 ± 7,48
C	N.D.	742,72 ± 42,29	577,01 ± 26,48	269,63 ± 7,97
D	N.D.	486,97 ± 39,59	300,03 ± 11,04	181,58 ± 8,93

Figura 3.6 - Eletroferograma dos padrões de L-aminoácidos nas concentrações de 10 mg L^{-1} para Trp; $25,2 \text{ mg L}^{-1}$ para Phe; 27 mg L^{-1} para His, $10,6 \text{ mg L}^{-1}$ para Tyr. Condições de análise: eletrólito constituído por H_3PO_4 30 mmol L^{-1} , SDS 100 mmol L^{-1} , metanol 25%; capilar com 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm efetivo; tensão 20 kV; polaridade negativa; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção em 200 nm. Padrão interno (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico



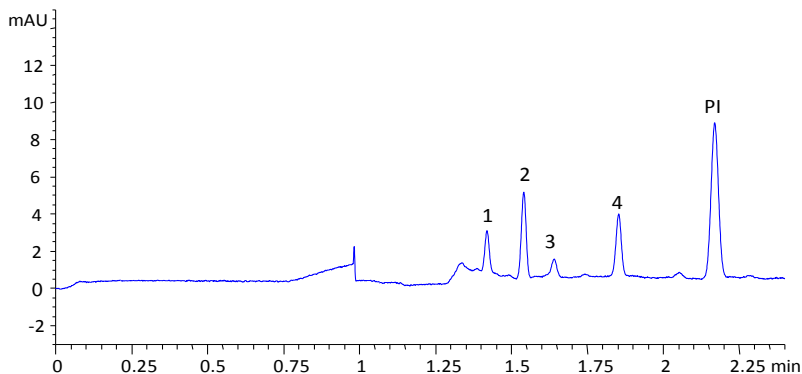
Fonte: o próprio autor.

Figura 3.7 - Eletroferograma da amostra A hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico.



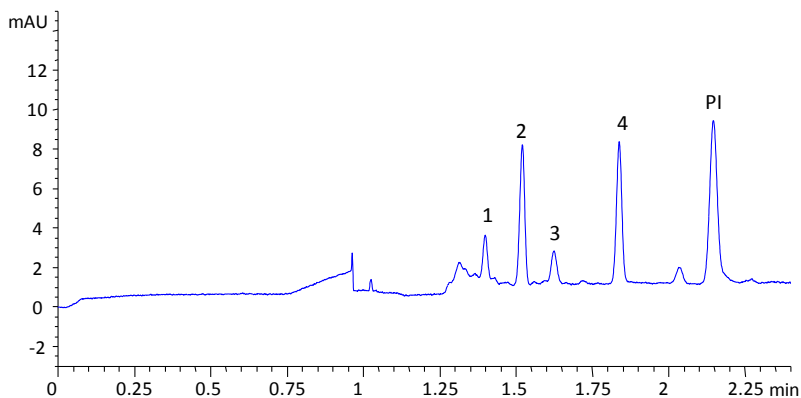
Fonte: o próprio autor.

Figura 3.8 - Eletroferograma da amostra B hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico.



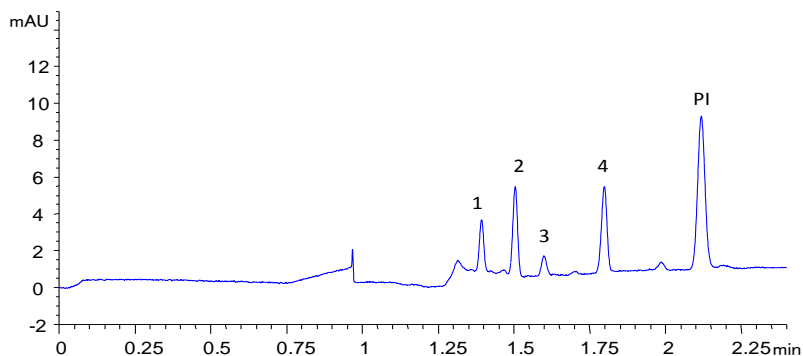
Fonte: o próprio autor.

Figura 3.9 - Eletroferograma da amostra C hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzóico.



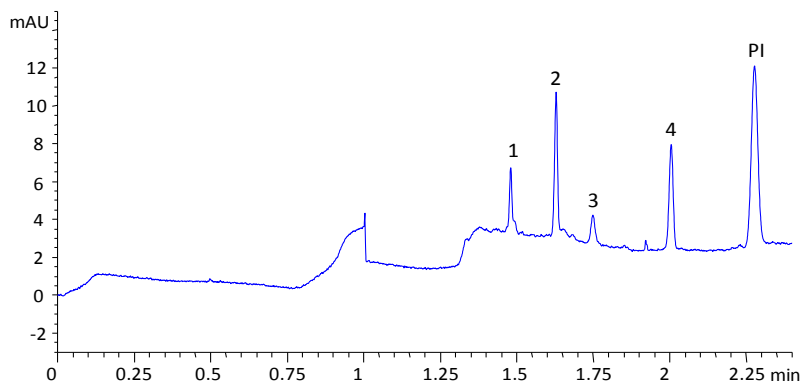
Fonte: o próprio autor.

Figura 3.10 - Eletroferograma da amostra D hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzótico



Fonte: o próprio autor.

Figura 3.11 - Eletroferograma da amostra E hidrolisada. Condições de análise: consultar Fig. 3.6. (1) Trp; (2) Phe; (3) His; (4) Tyr; (PI) ácido 3,5 dinitrobenzótico



Fonte: o próprio autor.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata de preparo e injeção, e apresentaram desvios padrões relativos inferiores a 12,4%.

Não podemos confiar nos valores encontrados para o triptofano, uma vez que os valores de recuperação foram baixos e quando realizado estudo comparativo pelo método com LC-MS/MS, este não foi detectado, indicando que o analito identificado como Trp possivelmente era um produto de degradação apresentando o mesmo espectro de absorção na região do UV. Diante do exposto, optou-se por não quantificar esse aminoácido. Para todas as amostras foram possíveis quantificar a fenilalanina, histidina e tirosina.

4.9 VALORES DE PROTEÍNA NAS AMOSTRAS

A determinação da concentração de nitrogênio total foi realizada de acordo o método de Kjeldahl modificado (AOAC, 991.20, 1995) e o resultado foi multiplicado pelo fator de conversão de 5,75 (nitrogênio: proteína). Os valores de proteína encontrados nas amostras estão apresentados na Tabela 3.17.

Tabela 3.17 – Valores de proteína nas amostras.

Amostra	Valor nominal*	Proteína**	Fenilalanina**
A	9,3	10 ± 1,6	0,44 ± 0,02
B	14,3	13,4 ± 2,8	0,46 ± 0,03
C	12,7	12,6 ± 0,5	0,74 ± 0,04
D	10,5	12,5 ± 2,1	0,49 ± 0,04
E	14,0	12,3 ± 5,8	0,46 ± 0,01

*Valores de proteína disponível no rótulo dos cereais analisados (g 100 g⁻¹)

**g 100 g⁻¹. Fonte: próprio autor.

Os valores apresentados na Tabela 3.17 indicam uma correlação satisfatória entre os teores de proteína apresentados no rótulo dos produtos em relação aos obtidos pelo método Kjeldahl, apesar de os produtores de alimentos utilizarem tabelas copiladas de composição nutricional para confecção dos seus rótulos. A percentagem de Phe em relação ao conteúdo total de proteína variou de 3,5 a 5,9%, para as amostras. De acordo com Marquez et al.. (1997), a concentração de Phe em proteínas varia de 4 a 6% e possui relação direta com o teor de proteínas existente em um alimento, portanto, quanto maior o teor de proteínas presente, maior o teor de fenilalanina (MARQUEZ et al., 1997).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento proposto utilizando o protocolo para validação do EURACHEM foi adequado para a validação intralaboratorial do método desenvolvido para determinação de fenilalanina, histidina e tirosina em amostras de cereais.

Tal procedimento permitiu a avaliação da linearidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez, com garantia de que as premissas relativas aos testes estatísticos aplicados não foram violadas.

Linearidade foi determinada, sem efeitos de matriz para os aminoácidos triptofano, fenilalanina e histidina, onde apenas a tirosina apresentou este efeito. A seletividade, precisão e exatidão do método foram comprovadas. Os limites de detecção e quantificação indicaram a capacidade do método em determinar os aminoácidos aromáticos nestas matrizes. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram a eficiência na utilização deste método desenvolvido para a determinação dos aminoácidos.

Com a realização do método comparativo utilizando LC-MS/MS foi possível verificar a provável formação de produtos de degradação do triptofano, pois esse aminoácido não foi detectado por esta técnica. Logo, o composto detectado como triptofano por CE, nas amostras hidrolisadas sinalizando um produto de degradação, deste modo, optou-se por não quantificar esse aminoácido aromático nas amostras analisadas.

6. REFERÊNCIAS

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 2. ed. 2005. 31p.

BRASIL. ANVISA(Agência Nacional de Vigilância Sanitária). REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde). Tradução dos Guias da EURACHEM. **Métodos adequados ao uso – Guia de laboratório para validação de métodos tópicos relacionados**. Disponíveis em <http://www.anvisa.gov.br/reblas/eurachem/index.htm>. Acesso em agosto de 2012.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **AOAC Peer-verified methods program. Manual on polices and procedures**. Gaithersburg, Maryland: AOAC; 1998. 35p.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1994. 620 p.

BARINGHAUS, L.; DANSCHKE, R.; HENZE, N. Recent and classical tests for normality – a comparative study. **Communications in Statistics – Simulation and Computation**, v. 18, p. 363-379, 1989.

BARRET, V.; LEWIS, T. **Outliers in statistical data**. 3ed. New York: John Wiley, 1994. 604p.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, p. 93-106, 1998.

BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. **LC GC**, p. 19-24, 2001.

CAVAZZA, A.; MERUSI, C.; CORRADINI, C.; BARROMEI, C.; SALVADEO, P. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. **Food Chemistry**, v. 120, p. 615-620, 2010.

CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CHOU, S.; SU, S.; SHIAU, H.; HWANG, D.; YU, P.; LEE, S. Protein and amino acid profiles in natural and artificial shark fins using capillary electrophoresis. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 1-3, 1998.

D'AGOSTINO, R.B.; STEPHENS, M.I.A. **Goodness of fit techniques**. New York: Marcel Dekker, 1986. p. 367-419.

DANZER, K.; KURRIE, L.A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 993-1014, 1998.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Willey, 1998. 706 p.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

GRUEN, L.C. Effect of other amino acids on recovery of tryptophan following acid hydrolysis. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 26, p.287-90, 1973.

HORWITZ, W. Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331-343, 1995.

ICH (Internation Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Validation of analytical procedures:methodology**. Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20p.

ISO (Internation Standards Organization). ISO 11095. **Linear calibration using reference materials**. Geneva: ISO, 1996. 29 p.

JIANG, X.; XIA, Z.; WEI, W.; GOU, Q. Direct UV detection of underivatized amino acids using capillary electrophoresis with online sweeping enrichment. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1927-1933, 2009.

JUNKEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquidchromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)—In-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 151-158, 2005.

KLAMPF, C.W.; BUCHBERGER, W.; TURNER, M.; FRITZ, J.S. Determination of underivatized amino acids in beverage samples by

capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 804, p. 349–355, 1998.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) **Contributions to probability and statistics**. Stanford: Stanford University Press, 1960. p.278-292.

LEWIS, S.W.; SWANN, L.M.; FORBES, S.L. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. **Talanta**, v. 81, p. 1697–1702, 2010.

MEYR, P.C.; ZUND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.

MONTGOMERY, D.C. RUNGER, G.C. **Applied statistics and probability for engineers**. New York: John Wiley & Sons, 1994, p. 471-624.

OGURI, S.; YOKOI, K.; MOTOHASE, Y. Determination of amino acids by high-performance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 787, p. 253-260, 1997.

PENKE, B.; FERENCZI, R.; KOVÁCS, K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 60, p. 45-50, 1975.

SEGURA-CARRETERO, A.; CORTACERO-RAMIREZ, S.; CRUCES-BLANCO, C.; ROMERO-ROMERO, M.L.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Simultaneous determination of multiple constituents in real beer samples of different origins by capillary zone

electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, p. 831–837, 2004.

SIMAT, T.J.; STEINHART, H. Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.490-498, 1998.

SOGA, T.; ROSS, G.A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 231–239, 1999.

TAVARES, M.F.M.; FUJIYA, N.M. Analysis of underivatized amino acids in protein hydrolysates for cosmetic application by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 562–568, 2003.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os planejamentos utilizados durante a otimização do método de separação dos aminoácidos determinaram que os fatores de concentração do H_3PO_4 e SDS apresentavam efeitos relevantes na resposta. Confirmando que os sistemas multivariados, fundamentados em planejamento de experimentos, permitem viabilizar o reconhecimento de condições de ótimo verdadeiro a partir de um reduzido número de experimentos.

A validação de métodos analíticos é a confirmação de que o método estudado possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação. protocolos de validação intralaboratorial de métodos de ensaio descritos na literatura, não apresentam um consenso em relação aos parâmetros de desempenho que devem ser avaliados, terminologias, definições, delineamento experimental e análise de dados. Condição que deve ser explorada em futuros estudos.

O procedimento proposto foi adequado para a validação intralaboratorial do método desenvolvido para determinação de triptofano, fenilalanina, histidina e tirosina em amostras de cereais em tempos inferiores a 2,5 minutos.

A linearidade foi determinada, sem efeitos de matriz para os aminoácidos triptofano, fenilalanina e histidina, onde apenas a tirosina apresentou este efeito. A seletividade, precisão e exatidão do método foram comprovadas, com resultados de recuperação satisfatórios para a Phe, Hist e Tyr e resultados de RSD (%) baixos para a precisão inter e intra-ensaio.

Os LD e LQ encontrados para o Trp, Phe, His e Tyr indicam a capacidade do método em determiná-los em cereais.

Os parâmetros de desempenho estudados comprovaram a eficiência na utilização do método e demonstraram a aplicabilidade da eletroforese capilar para a determinação de fenilalanina, histidina e tirosina em amostras comerciais de cereais.

Estudos de validação precisam ser realizados para adequar o método a aplicação em outras matrizes alimentícias, principalmente no que concerne estudos relativos ao efeito de matriz.

Em virtude do elevado tempo de preparo das amostras pela hidrólise ácida convencional, estudos serão realizados para desenvolver uma metodologia de hidrólise ácida assistida por micro-ondas a fim de reduzir de forma significativa o tempo de preparo das amostras.