

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos**

Lorena Thais Souza Dias

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA  
DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA EM FARINHA DE TRIGO EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR UV-VIS**

Belo Horizonte  
2022

Lorena Thais Souza Dias

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA  
DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA EM FARINHA DE TRIGO EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR UV-VIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciência de  
Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo  
Coorientadora: Profa. Renata Adriana Labanca

Belo Horizonte

2022

D541o Dias, Lorena Thais Souza.  
Otimização e validação de metodologia quantitativa para determinação de fenilalanina em farinha de trigo empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS [recurso eletrônico] / Lorena Thais Souza Dias. – 2022.  
1 recurso eletrônico (80 f. : il.) : pdf.

Orientadora: Raquel Linhares Bello de Araújo.  
Coorientadora: Renata Adriana Labanca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Farinhas – Teses. 2. Fenilalanina – Teses. 3. Fenilcetonúria – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 5. Validação de método – Teses. I. Araújo, Raquel Linhares Bello de. II. Labanca, Renata Adriana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA DETERMINAÇÃO DE FENILALANINA EM FARINHA DE TRIGO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR UV-VIS

**LORENA THAIS SOUZA DIAS**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 28 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo (Orientadora e presidente da comissão) - UFMG  
Profa. Dra. Márcia Cassimira Marcos Ribeiro - FUNED  
Dra. Aretha Priscilla Silva Andrade - UFMG  
Dra. Viviane Dias Medeiros Silva - UFMG

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Aretha Priscilla Silva Andrade, Usuária Externa**, em 28/07/2022, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Dias Medeiros Silva, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Cassimira Marcos Ribeiro, Usuária Externa**, em 29/07/2022, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Linhares Bello de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)



[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **1639082** e o código CRC **E6C0BD1A**.

---

Referência: Processo nº 23072.208450/2021-33

SEI nº 1639082

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho de pesquisa a todos os pacientes fenilcetonúricos que desde os primeiros dias de vida, enfrentam desafios para manter uma alimentação protéica adequada a fim de garantir uma melhor qualidade de vida.

## **Agradecimentos**

Iniciei o mestrado no mesmo período que a pandemia da Covid-19 se agravou aqui no Brasil e, portanto, começo agradecendo a Deus pelo cuidado com minha saúde, e a de todos os meus familiares e amigos, e por ter me dado forças para chegar até o final.

Agradeço as minhas orientadoras, Raquel Linhares e Renata Labanca, pela confiança, apoio e incentivo para a realização do projeto em um momento tão conturbado de uma pandemia.

A todos os membros do Laboratório de Química de Alimentos pelas valiosas contribuições durante o processo, em especial, Elaine Minighin, Ana Coeli e Maria José Cota.

Sou extremamente grata a toda equipe da Funed, a Mariana Almeida por liderar toda a parte burocrática para que essa parceria se firmasse; Mariem Rodrigues, Maria de Fátima Gomides e Shirley Chaves pelo acolhimento, dedicação e por partilhar seus vastos conhecimentos e experiência durante o desenvolvimento do projeto, que fizeram grande diferença no resultado final; Daniel Oliveira por toda a contribuição que envolviam os cálculos estatísticos; Cláudia Lima por sempre me ajudar com a limpeza das vidrarias, processo esse, que é de grande valia para obter bons resultados.

Agradeço também à minha família por me apoiarem e confiarem que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou.

Aos meus amigos que são meu suporte e que deixam a vida mais leve.

## Epígrafe

“A expressão mais inteligente, mais forte que existe  
para criar renovação, reinvenção,  
inovar a vida, inovar a capacidade e reforçar  
é a expressão: “NÃO SEI”.  
É a expressão que inaugura o novo. ”

(Mario Sérgio Cortella)

## RESUMO

A fenilcetonúria é considerada um erro inato do metabolismo associado a fenilalanina. É causada por mutações no gene que codifica a enzima hepática fenilalanina hidroxilase, que é responsável pela conversão de fenilalanina em tirosina. A ausência dessa enzima no organismo leva ao acúmulo de fenilalanina no sangue, cérebro e tecidos. O excesso é neurotóxico levando a defeitos no desenvolvimento neuromotor e neurocognitivo. O tratamento básico consiste no consumo de alimentos com baixo teor proteico associado à um substituto proteico isento ou com taxas muito baixas de fenilalanina. Portanto, é essencial dispor da informação sobre a quantidade de fenilalanina presente em alimentos para manter concentrações séricas de fenilalanina de acordo com as recomendações e sobre as tolerâncias individuais. Com base no triângulo de composição de alimentos da AOAC, a farinha de trigo foi o produto selecionado para esse estudo, embora seja considerada um alimento restrito na dieta dos fenilcetonúricos. Isso porque ela pertence a um setor, desse triângulo, no qual os alimentos possuem quantidade de proteína de 0 a 33% e, nesse contexto, um método analítico validado é aplicável a outros alimentos que pertencem a esse mesmo setor. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método analítico para quantificar fenilalanina em farinha de trigo empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta. A proteína presente na farinha de trigo foi hidrolisada em ácido clorídrico 6 M com fenol durante 22 horas e temperatura de 110 °C. Os aminoácidos livres foram derivatizados com fenilisotiocianato. A linearidade encontrada foi na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL (correspondentes a 49,97 a 237,34 mg/100g de fenilalanina em farinha de trigo), com efeitos de matriz significativos. As porcentagens de recuperação médias para os níveis estudados correspondentes a 62,46, 124,92 e 224,85 mg/ 100g de fenilalanina em farinha de trigo foram de 97,56%, 93,57% e 87,49%, respectivamente. Os desvios padrão relativos para esses mesmos níveis estudados sob condições de repetibilidade e de precisão intermediária foram de 4,49%, 6,32% e 4,31% e de 4,90%, 6,95% e 5,11%, respectivamente. O limite de detecção foi de 3,20 mg/100g e o de quantificação de 12,80 mg/100g. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método para o monitoramento e controle de teores de fenilalanina em farinha de trigo.

Palavras-chave: fenilalanina; fenilcetonúria; cromatografia líquida de alta eficiência; validação de métodos.

## ABSTRACT

Phenylketonuria is considered an inborn error of metabolism associated with phenylalanine. It is caused by mutations in the gene that encodes the liver enzyme PAH, which is responsible for converting phenylalanine to tyrosine. The absence of this enzyme in the body leads to the accumulation of phenylalanine in the blood, brain and tissues. Excess is neurotoxic leading to defects in neuromotor and neurocognitive development. The basic treatment consists of the consumption of foods with low protein content associated with a protein-free substitute or with very low levels of phenylalanine. Therefore, it is essential to have information on the amount of phenylalanine present in foods to maintain serum phenylalanine concentrations in accordance with recommendations and individual tolerances. Based on the AOAC food composition triangle, wheat flour was selected for this study, although it is considered a restricted food in the diet of phenylketonurics. This is because it belongs to a sector of this triangle, in which foods have a protein content of 0 to 33% and in this context, a validated analytical method is applicable to other foods that belong to this same sector. In view of the above, the objective of the present work was to optimize and validate an analytical method to quantify wheat flour using high performance liquid chromatography with an ultraviolet detector. The protein present in the wheat flour was hydrolyzed in 6 M hydrochloric acid with phenol for 22 hours at a temperature of 110 °C. Free amino acids were derived with phenylisothiocyanate. Linearity found was in the range of 0.20 to 0.95 nmol/mL (corresponding to 49.97 to 237.34 mg/100g of phenylalanine in wheat flour), with significant matrix effects. The average recovery percentages for the levels studied corresponded to 62.46; 124.92 and 224.85 mg/100g of wheat flour phenylalanine were 97.56%, 93.57% and 87.49%, respectively. The relative standard deviations for these same levels studied under repeatability and intermediate precision conditions were 4.49%, 6.32% and 4.31% and 4.90%, 6.95% and 5.11%, respectively. The detection limit was 3.20 mg/100g and the quantification limit was 12.80 mg/100g. The performance parameters studied indicated the suitability of the method for monitoring and controlling phenylalanine levels in wheat flour.

Keywords: phenylalanine; phenylketonuria; high performance liquid chromatography; Method validation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Hidroxilação da fenilalanina.....	22
<b>Figura 2.</b> Sistema básico de CLAE.....	27
<b>Figura 3.</b> Detector UV de comprimento de onda fixo.....	28
<b>Figura 4.</b> Reação química do reagente derivatizante PITC com aminoácido.....	29
<b>Figura 5.</b> Curva de calibração por método de adição-padrão. (a) construção do gráfico de calibração. (b) determinação da massa por extrapolação.....	36
<b>Figura 6.</b> Esquema do triângulo da AOAC baseado no teor de proteína, gordura e carboidrato. .....	39
<b>Figura 7.</b> Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 110 °C durante 22 horas...	56
<b>Figura 8.</b> Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 150 °C durante 6 horas ....	57
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas sobrepostos do aminoácido ácido glutâmico e da glutamina antes e após o processo de hidrólise ácida.....	57
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas sobrepostos do aminoácido ácido aspártico e da asparagina antes e após o processo de hidrólise ácida .....	58
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas sobrepostos do aminoácido cistina e da cisteína antes e após o processo de hidrólise ácida.....	58
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas sobrepostos do aminoácido triptofano antes e após o processo de hidrólise ácida.....	58
<b>Figura 13.</b> Zoom dos cromatogramas sobrepostos obtidos das diferentes condições de hidrólise ácida, na região do pico da PHE.....	59
<b>Figura 14.</b> Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1M (0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL), com indicação que nenhum outlier foi diagnosticado pelo teste de resíduos padronizados Jackknife .....	60

<b>Figura 15.</b> Gráficos de probabilidade normal das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL.....	61
<b>Figura 16.</b> Gráficos de Durbin-Watson da curva, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL.....	62
<b>Figura 17.</b> Representação da homogeneidade das variâncias das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M (0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL) pelo teste de Levene modificado .....	63
<b>Figura 18.</b> Curvas de calibração obtidas em solvente e em matriz de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação .....	65
<b>Figura 19.</b> Curvas de calibração de PHE no solvente e na matriz de farinha de trigo obtidas no ensaio de avaliação do efeito de matriz, na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL .....	67
<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido para o aminoácido PHE derivatizado .....	69
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido para os 22 aminoácidos analisados.....	69
<b>Figura 22.</b> Cromatograma obtido para branco derivatizado. Os picos em destaque são compostos do agente de derivatização .....	69
<b>Figura 23.</b> Espectro no ultravioleta obtido para PHE .....	70
<b>Figura 24.</b> Espectro no ultravioleta da PHE obtido na literatura.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Faixa de Aceitação da Recuperação .....	35
<b>Tabela 2.</b> Critérios de aceitação para repetibilidade .....	37
<b>Tabela 3.</b> Preparo da solução derivatizante com PITC .....	44
<b>Tabela 4.</b> Massa correspondente para concentração final de 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ de cada padrão de aminoácido, exceto para a cistina que a concentração final foi de 1,25 $\mu\text{mol/mL}$ .....	46
<b>Tabela 5.</b> Gradiente de eluição das fases móveis do método cromatográfico .....	50
<b>Tabela 6.</b> Esquema utilizado para avaliação da precisão e recuperação do método .....	53
<b>Tabela 7.</b> Primeiro gradiente de concentração aplicado.....	55
<b>Tabela 8.</b> Segundo gradiente de concentração aplicado.....	55
<b>Tabela 9.</b> Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para as curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M (0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL) .....	64
<b>Tabela 10.</b> Comparações entre as interseções e inclinações obtidas para a curva em matriz de farinha de trigo com a estimada para a curva em solvente, na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL. 66	
<b>Tabela 11.</b> Tempo de retenção dos 22 aminoácidos analisados para a seletividade .....	68
<b>Tabela 12.</b> Recuperações obtidas pelos analistas 1 e 2 para os três níveis de concentração estudado.....	71
<b>Tabela 13.</b> Valores de $G_1$ , $G_2$ , $G_3$ para cada nível estudado na recuperação e precisão.....	72
<b>Tabela 14.</b> Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos obtidos nos estudos de recuperação em diferentes níveis de concentração.....	73
<b>Tabela 15.</b> Desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e precisão intermediária, obtidos em diferentes níveis de concentração .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Collaboration</i>
BH4	Tetrahidrobiopterina
CGCRE	Coordenadoria Geral de Acreditação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DHPR	Dihidrobiopterina redutase
DPR <sub>r</sub>	Desvio padrão relativo de repetibilidade
DPR <sub>R</sub>	Desvio padrão relativo de precisão intermediária
DIVISA	Divisão de Vigilância Sanitária
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	Erros inatos do metabolismo
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GTP	Trifosfato de guanósina
GTPCH	Trifosfato de guanósina ciclo-hidrolase
HILIC	Cromatografia de interações hidrofílicas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOM	Instituto Octávio Magalhães
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LAM	Laboratório de Análise de Microcomponentes
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Espectrometria de massa
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PCD	4a-carbinolamina-desidratase

pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Fenilalanina
PITC	Fenilisotiocianato
PTNT	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTPS	6-piruvoil-tetra-hidropterina sinatse
PKU	Fenilcetonúria
q	Quinóide
R	Coefficiente de Pearson
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	Recém-nascido
S	Desvio padrão
s <sup>2</sup>	Variância amostral
SR	Sepiapterina redutase
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## LISTA DE NOTAÇÕES OU SÍMBOLO

°C	Graus Celsius
g	Gramas
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar (mol/L)
µg	Micrograma
µmol	Micromol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nmol	Nanomol
n°	Número
%	Porcentagem
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
3.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	22
3.2 Fenilcetonúria.....	23
3.2.1 Epidemiologia .....	24
3.2.2 Diagnóstico e tratamento.....	25
3.2.3 Legislação .....	26
3.3 Metodologia Analítica .....	27
3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	27
3.3.2 Detector Ultravioleta.....	28
3.4 Derivatização.....	29
3.5 Validação de metodologia analítica.....	30
3.5.1 Seletividade .....	31
3.5.2 Linearidade.....	32
3.5.3 Limite de Detecção .....	34
3.5.4 Limite de Quantificação.....	34
3.5.5 Tendência/Recuperação .....	35
3.5.6 Precisão .....	37
3.6 Triângulo de Composição de Alimentos AOAC.....	40
3.7 Farinha de Trigo .....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1 Materiais .....	42
4.1.1 Reagentes .....	42
4.1.2 Vidrarias.....	43
4.1.3 Equipamentos.....	43

4.1.4 Amostra.....	43
4.2 Preparo das soluções .....	43
4.2.1 Solução para hidrólise ácida das proteínas.....	44
4.2.2 Soluções para a derivatização dos aminoácidos.....	44
4.2.3 Soluções para análise cromatográfica .....	45
4.2.4 Soluções utilizadas para análise da seletividade.....	46
4.2.5 Soluções utilizadas para linearidade e efeito matriz .....	48
4.2.6 Soluções utilizadas para precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e recuperação .....	49
4.2.7 Soluções utilizadas para limite de detecção e quantificação .....	49
4.3 Métodos.....	49
4.3.1 Hidrólise da proteína presente na amostra .....	49
4.3.2 Derivatização dos aminoácidos .....	50
4.3.3 Sistema cromatográfico e condições do método analítico .....	50
4.3.4 Validação do método analítico .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 Otimização .....	55
5.1.1 Condições cromatográficas .....	55
5.1.2 Hidrólise ácida.....	57
5.2 Validação .....	60
5.2.1 Linearidade e Efeito Matriz.....	60
5.2.2 Seletividade .....	68
5.2.3 Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermediária.....	72
5.2.4 Limite de Detecção e Quantificação .....	75
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que geralmente correspondem a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica. Ocasionalmente, portanto, alguma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (EL HUSNY; FERNADES-CALDATO, 2006). As aminoacidopatias são EIM de aminoácidos, sendo que a fenilcetonúria (PKU) é o que ocorre com mais frequência e está associada ao metabolismo da fenilalanina (PHE) (BRASIL, 2019). A PHE é um aminoácido nutricionalmente essencial, ou seja, deve ser obtido por meio da alimentação e é indispensável à síntese protéica em tecidos de mamíferos. No organismo, a maior parte é oxidada primariamente em tirosina, pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), tendo como co-fator a tetraidrobiopterina (BH4) (MARTINS et. al., 2006).

A PKU é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações no gene que codifica a enzima hepática PAH. A ausência ou atividade deficiente dessa enzima impede a conversão de PHE em tirosina, causando acúmulo de PHE no organismo. Dependendo do grau de atividade de funcionamento da enzima PAH, níveis variados e crescentes de PHE podem ocorrer no sangue, cérebro e tecidos, sendo o excesso neurotóxico e levando a defeitos no desenvolvimento neuromotor e neurocognitivo (BRASIL, 2019). Dessa forma, os pacientes podem desenvolver deficiência intelectual grave, epilepsia e problemas comportamentais, psiquiátricos e de movimento, bem como leve pigmentação da pele, olhos e cabelos, eczema e odor de mofo (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

O diagnóstico da PKU deve ser preferencialmente realizado no período neonatal, antes do aparecimento dos sintomas clínicos, uma vez que a lesão neurológica é irreversível (SOARES, 2014). Aqui no Brasil, o exame de triagem é conhecido como teste do pezinho, que deve ser realizado preferencialmente, entre o 3º e 5º dia de vida (NUPAD, 2022). Existem várias formas de classificação da PKU. Os critérios geralmente incluem as concentrações plasmáticas da PHE no diagnóstico (paciente ainda sem tratamento), na tolerância à PHE e no grau de deficiência da PAH (BRASIL, 2019). As formas menos graves de deficiência de PAH são chamadas hiperfenilalaninemia (HPA) leve, cuja concentração sanguínea de PHE é de 120–360 µmol/L. Já as formas mais graves são chamadas de PKU clássica cuja concentração sanguínea de PHE é maior que 360 µmol/L (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

Se identificada como positiva a doença, o tratamento deve ser iniciado imediatamente, o qual é essencialmente dietético, sendo esse abordado em três aspectos: restrição da ingestão

de proteína natural, suplementação com mistura de aminoácidos isentos de PHE e consumo de alimentos com baixo teor proteico.

Atualmente, o que tem disponível de dados sobre o teor de PHE nos alimentos advêm da obrigatoriedade das indústrias de alimentos a encaminhar à ANVISA a quantidade de PHE presente em alimentos com teor de proteína entre 0,10 a 5,00%, conforme a RDC nº 617, de 9 de março de 2022 (BRASIL, 2022). Com esses dados, a ANVISA desenvolveu um painel de conteúdo de PHE em alimentos, tanto *in natura* quanto industrializados, com o intuito de guiar e ser referência para profissionais de saúde que prescrevem, elaboram dietas e realizam o acompanhamento clínico desses pacientes (ANVISA, 2012).

Ainda existe uma escassez de informações sobre o conteúdo de PHE em diversos alimentos. Contudo, é de extrema importância, dispor da informação sobre a quantidade de PHE em produtos alimentícios naturais e processados incluídos nas dietas desses pacientes. Pois isso contribui para um melhor monitoramento das concentrações de PHE no sangue dos pacientes fenilcetonúricos, a fim de manter de acordo com as recomendações e sobre as tolerâncias individuais (MACDONALD et al., 2020).

Nesse contexto, há uma necessidade de quantificar o teor de PHE de uma gama de alimentos, a fim de ampliar a possibilidade de novas dietas para esses pacientes, visando uma melhora na terapia nutricional e a integração social desses indivíduos.

Em alimentos, a escolha do melhor método de análise é uma etapa muito importante, pois o alimento é, geralmente, uma amostra muito complexa, em que os vários componentes da matriz podem estar interferindo entre si (CUNHA, BARONI e CUNHA, 2011). Portanto, é essencial quantificar a PHE empregando técnicas analíticas modernas, que são capazes de determinar quantidades precisas e exatas presentes nos alimentos.

Diferentes técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para determinar o teor de PHE nos alimentos, tais como cromatografia líquida e gasosa, acopladas a diferentes detectores como ultravioleta, fotodiodo, fluorescência e espectrometria de massa (BAI et al., 2019; LIYANAARACHCHI et al., 2018; PALOMINO-VASCO et al., 2019; TASAKIS; TOURAKI, 2018; TSOCHATZIS; PAPAGEORGIOU; KALOGIANNIS, 2019; ZHANG et al., 2018.). Além de técnicas cromatográficas também são utilizadas a espectrofotometria e eletroforese capilar (CARREIRA et. al. 2009; PASSOS; CIESLAROVA; SIMIONATO, 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica que permite a separação, identificação e quantificação de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS et al., 2006).

Antes da análise de aminoácidos, as proteínas precisam ser hidrolisadas a fim de obter os aminoácidos livres constituintes. O método mais comumente aplicado é a hidrólise por digestão com um ácido inorgânico forte (TSOCHATZIS; PAPAGEORGIOU; KALOGIANNIS, 2019). Ainda, a maioria dos aminoácidos não possui capacidade de absorção no ultravioleta tornando necessário uma etapa de derivatização (ZHENG et. al., 2015), que consiste basicamente de uma reação química, que gera novos produtos com melhores propriedades cromatográficas, por exemplo.

A fim de garantir a qualidade necessária aos resultados analíticos, os métodos cromatográficos devem ser validados de acordo com procedimentos muito bem definidos (LANÇAS, 2004). Validação do método é basicamente confirmar que o método em consideração tem recursos consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM, 2014).

Para demonstrar a aplicabilidade, a uma variedade de alimentos, de um método analítico validado foi desenvolvido o triângulo de composição de alimentos da AOAC, o qual é dividido em nove setores, baseado na composição de macronutrientes das matrizes alimentares. Contudo, se um método analítico fornecer resultados precisos para um alimento testado, também deve fornecer resultados precisos para os outros alimentos desde que se enquadrem no mesmo setor (AOAC, 1993; WISE; PHILLIPS, 2019). A farinha de trigo, embora seja considerada um alimento restrito nas dietas para os pacientes fenilcetonúricos, encaixa-se no setor 5 do triângulo de composição de alimentos da AOAC, cuja as quantidades de proteína e gordura variam de 0 a 33% e carboidrato de 67 a 100%. Portanto, esse setor compreende vários alimentos, *in natura* e industrializados, que podem ser consumidos por fenilcetonúricos.

Diante deste contexto, foi otimizado e validado um método analítico cromatográfico para a quantificação de PHE em farinha de trigo empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (UV). Esse estudo possibilitará a aplicação desse método analítico para uma variedade de alimentos, dentro do setor 5 do triângulo de composição de alimentos da AOAC.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Otimizar e validar uma metodologia analítica empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV para quantificar o teor de fenilalanina em farinha de trigo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar as condições experimentais para realizar a hidrólise ácida da proteína presente na farinha de trigo;
- Otimizar as condições experimentais do método cromatográfico;
- Validar o método otimizado cromatográfico, incluindo os parâmetros linearidade, seletividade e efeitos de matriz, recuperação, precisão e limites de detecção e quantificação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que geralmente correspondem a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica. Ocasionalmente, portanto, alguma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (EL HUSNY; FERNADES-CALDATO, 2006). O primeiro EIM foi descrito por Archibald Garrod em 1902, que destacava os aspectos genéticos das doenças. Portanto, esses EIM são considerados a causa das doenças metabólicas hereditárias. Atualmente, estima-se que existem mais de 700 EIM e que podem ser classificadas de várias maneiras. Dentre elas, pode-se citar doenças de pequenas moléculas (aminoacidopatias, distúrbios do ciclo da uréia, acidemias orgânicas, distúrbios da oxidação de ácidos graxos, distúrbios de purinas e pirimidinas e distúrbios do metabolismo de metais) e doenças de grandes moléculas (como distúrbios de armazenamento lisossômico, distúrbios de armazenamento de glicogênio, distúrbios peroxissomais e distúrbios congênitos de glicosilação) (FERREIRA; VAN KARNEBEECK, 2019).

O diagnóstico precoce, muitas vezes detectáveis já na triagem neonatal, contribui para impedir o agravamento e a irreversibilidade dos sintomas (EL HUSNY; FERNADES-CALDATO, 2006). As manifestações clínicas podem ter início desde a vida embrionária até a vida adulta e constituem um quadro de intoxicação aguda caracterizado por vômitos, desidratação, acidose metabólica, alcalose respiratória, hipoglicemia, hiperglicemia, hepatomegalia, icterícia, hiperamonemia, letargia e coma, entre outros (MARTINS et. al., 2006).

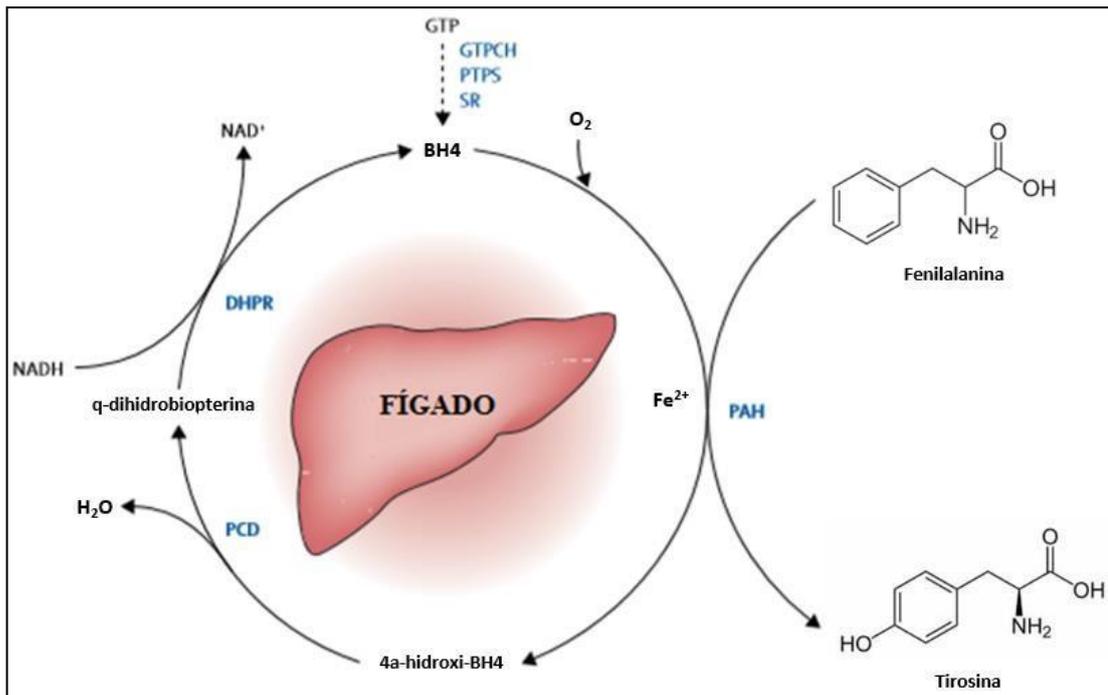
O tratamento depende muito do erro inato do metabolismo responsável pela doença e, assim como o diagnóstico, quando realizado de forma precoce, torna-se essencial para a melhora das condições da doença. Por exemplo, o tratamento que envolve a dieta está direcionado para a redução de substrato acumulado, para a suplementação de um produto, para a estimulação do bloqueio metabólico com co-fatores ou precursores enzimáticos, ou ainda para a desintoxicação por metabólitos (EL HUSNY; FERNADES-CALDATO, 2006).

Essa medida pode salvar a vida de muitos pacientes com EIM que são passíveis de tratamento, modificando assim a vida do paciente e seus familiares (MARTINS et. al., 2006).

### 3.2 Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é uma aminocidopatia, ou seja, é um distúrbio causado por um EIM de aminoácidos. A PKU foi descoberta por Asbjörn Fölling em 1934 que detectou corpos de fenilcetona na urina de indivíduos afetados, responsáveis por um odor característico (VAN WEGBERG et. al., 2017). Jervis, em 1947, sugeriu que o erro metabólico em PKU era a incapacidade de converter a PHE em tirosina (MARTINS et. al., 2006). Além disso, é sabido que a PKU é um EIM de herança autossômica recessiva. Sendo assim, o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da PKU, define como uma doença genética, autossômica recessiva caracterizada por mutações no gene que codifica a enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH). Essa enzima é responsável pela hidroxilação da PHE, que requer também do cofator BH4, oxigênio molecular ( $O_2$ ) e ferro ( $Fe^{2+}$ ), para a conversão em tirosina. Durante a hidroxilação, o BH4 é oxidado a um intermediário 4a-hidroxi-BH4, que é subsequentemente regenerado de volta para BH4 via quinonoide (q) dihidrobiopterina pelas enzimas 4a-carbinolamina-desidratase (PCD) e pela dihidropteridina redutase dependente de NADH (DHPR). BH4 é sintetizado a partir de trifosfato de guanosina (GTP) por três enzimas adicionais a saber: GTP ciclo-hidrolase I (GTPCH), 6-piruvil-tetra-hidropterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase (SR). Mutações em genes que codificam para PCD, DHPR, GTPCH, PTPS e SR resultam em deficiência de BH4 (BLAU et. al., 2010) (**Figura 1**).

**Figura 1.** Hidroxilação da fenilalanina.



Fonte: Adaptado de BLAU; SPRONSEN; LEVY, 2010

Dependendo do grau de atividade de funcionamento da enzima PAH, níveis variados e crescentes de PHE podem ocorrer no sangue, cérebro e tecidos, sendo o excesso neurotóxico e levando a defeitos no desenvolvimento neuromotor e neurocognitivo (BRASIL, 2019). Concomitantemente, ocorre uma deficiência de tirosina, que possui vários destinos metabólicos, incluindo a produção dos neurotransmissores dopamina, adrenalina e norepinefrina, conversão em tiroxina na glândula tireoide e em melanina nos melanócitos, e catabolismo completo em acetoacetato (uma cetona) e taxa de fumarato (um intermediário do ciclo de Krebs) para ser utilizado como energia (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

Na literatura estão descritos possíveis mecanismos pelas quais concentrações elevadas de PHE no cérebro causam disfunção. Foram mostrados em dois estudos, tanto *in vitro* (HORSTER et. al.; 2006) quanto *in vivo* (SCHLEGEL et. al., 2016), que a densidade de sinapses é drasticamente reduzida na PKU. Além disso, a PHE pode prejudicar a síntese de colesterol (através da inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase) ou de outros lipídios cerebrais e, assim, interferir na produção de mielina (VAN SPRONSEN et. al., 2021). Também foi observada a redução da taxa de metabolismo cerebral da glicose em um estudo realizado com camundongos hiperfenilalaninêmicos causando grave comprometimento da memória e anormalidades comportamentais (WINN et. al. 2016; VAN SPRONSEN et. al., 2021). A passagem de aminoácidos aromáticos (PHE, tirosina e triptofano) e outros grandes aminoácidos neutros (incluindo leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina e histidina), da circulação para o cérebro através da barreira hematoencefálica, é facilitada pelo transportador de aminoácidos LAT1 (VAN SPRONSEN et. al., 2021). No entanto, com o acúmulo de PHE no organismo, sugere-se o fluxo prejudicado de outros aminoácidos aromáticos e neutros, levando à sua deficiência no cérebro (GROOT et. al., 2010). Isso contribui para uma deficiência de neurotransmissores, como por exemplo serotonina, norepinefrina e dopamina, já que esses aminoácidos são substratos para a síntese dos mesmos (WINN et. al. 2016; VAN SPRONSEN et. al., 2021). Sabe-se que esses neurotransmissores estão relacionados a sensações de alegria, prazer, motivação e bem-estar geral. Esses são alguns mecanismos que explicam os distúrbios neuromotores e neurocognitivos apresentados pelos pacientes fenilcetonúricos.

### 3.2.1 Epidemiologia

A prevalência de PKU varia entre etnias e entre diferentes regiões geográficas em todo o mundo, geralmente é mais alta em populações brancas ou do leste asiático, sendo que a média de prevalência global é estimada em 1:10.000 recém-nascidos (RN).

Países nos quais ocorrem com mais frequência casamento consanguíneo, ou seja, aqueles que ocorrem entre parentes próximos, a taxa de PKU é maior. Por exemplo, na Turquia, na província de Fars no Irã e na República Russa de Karachay-Cherkessia, a prevalência é de 1:4.370, 1:4.698 e 1:850 RN, respectivamente (VAN SPRONSEN et. al., 2021). A prevalência na América do Sul varia de aproximadamente 1:25.000–50.000 nascidos vivos, com prevalência menor no Norte do que no Sul do continente (BORAJO, 2007).

Segundo informações referentes aos serviços de referência em triagem neonatal dos 27 estados brasileiros, foi encontrada uma incidência de 1:25.326 RN. Conforme o Ministério da Saúde, 94 novos casos de PKU foram diagnosticados em 2016, o que corresponde a uma incidência de 1:30.402 RN, considerando que houve 2.857.800 nascimentos no Brasil naquele ano (BRASIL, 2019).

### **3.2.2 Diagnóstico e tratamento**

O diagnóstico da PKU deve ser preferencialmente realizado no período neonatal, antes do aparecimento dos sintomas clínicos, uma vez que a lesão neurológica é irreversível (SOARES, 2014). Atualmente, há implementação da triagem neonatal para PKU na maioria dos países/regiões do mundo (VAN SPRONSEN et. al., 2021). Aqui no Brasil, o exame de triagem é conhecido como teste do pezinho, que deve ser realizado preferencialmente, entre o 3º e 5º dia de vida (NUPAD, 2022). Esse exame faz parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PTNT), sendo realizado a partir de amostras de sangue retiradas do calcânhar do recém-nascido e colhidas em papel de filtro (SOARES, 2014). Após é realizada a análise bioquímica para a avaliação das concentrações de PHE no sangue. Existem diferentes metodologias de triagem laboratorial, como por exemplo, o ensaio de inibição bacteriana (teste de Guthrie), microensaio fluorimétrico e espectrometria de massas (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

A HPA, nome dado a elevados níveis séricos de PHE, é considerada anormalidade bioquímica central da PKU, na qual as concentrações normais de PHE no sangue (35–120  $\mu\text{mol/L}$ ) são excedidas (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

Existem várias formas de classificação da PKU. Os critérios geralmente incluem as concentrações plasmáticas da PHE no diagnóstico (paciente ainda sem tratamento), na tolerância à PHE e no grau de deficiência da PAH (BRASIL, 2019). Considerando as primeiras diretrizes europeias, quando o paciente ainda sem tratamento apresentar níveis séricos entre 120 e 360  $\mu\text{mol/L}$  é classificado como HPA leve; se for acima de 360  $\mu\text{mol/L}$  é classificado como

fenilcetonúrico, que pode ser categorizado como BH4 responsiva ou BH4 não responsiva (VAN SPRONSEN et. al., 2021).

Se identificada como positiva a doença, o tratamento deve ser iniciado imediatamente e consiste basicamente em uma dieta baixa em PHE combinada com suplementos de L-aminoácido livres isentos ou com muito baixa concentração em PHE (ANVISA, 2012). Dessa forma, irá prevenir o acúmulo excessivo de PHE no sangue e manter a neurocognição e funcionamento psicossocial normais.

A PHE é um aminoácido essencial, ou seja, aquele que deve ser obtido através da alimentação. Diferentes alimentos contêm diferentes quantidades de PHE. Em fontes de proteína animal (por exemplo, carne, peixe, leite e ovos) e cereais (por exemplo, farinha de trigo e cereais matinais), geralmente a quantidade de alimento calculada para fornecer 1 g de proteína fornecerá aproximadamente 50 mg de PHE. Já frutas e vegetais geralmente contêm um teor de PHE menor e mais variável, entre 20 a 40 mg por 1 g de proteína (MACDONALD et. al., 2020).

Portanto, o tratamento dietético compreende três aspectos: restrição da ingestão de proteína natural, suplementação com mistura de aminoácidos isentos de PHE e consumo de alimentos com baixo teor proteico.

Entretanto, o manejo dietético é complexo e desafiador, uma vez que, a dieta é extremamente restritiva e as fórmulas isentas de PHE apresentam odor e paladar característicos, sendo pouco palatáveis (SOARES, 2014). Além disso, deve ser mantida por toda a vida. Na PKU, é comum que as concentrações sanguíneas de PHE estejam fora dos limites ideais, principalmente em adolescentes e adultos, indicando adesão inadequada ao tratamento (MACDONALD et. al., 2010). O controle e a adesão ao tratamento devem ser monitorados pelos resultados de coletas sanguíneas frequentes, e pela avaliação dos registros alimentares de setenta e duas horas (SOARES, 2014)

### **3.2.3 Legislação**

A RDC nº 617, de 9 de março de 2022, dispõe sobre a obrigatoriedade da realização de análises laboratoriais e da transmissão de informações sobre os teores de fenilalanina em alimentos industrializados com teor de proteína entre 0,10% e 5,00% (BRASIL, 2022). Por sua vez, a Anvisa disponibiliza as informações em seu sítio eletrônico, recebidas das empresas responsáveis pelos alimentos, *in natura* e industrializados, abrangidos por esta resolução. As informações são disponibilizadas por meio de um painel com opções de consulta por produto,

marca e categoria, além da possibilidade da busca pela quantidade específica de PHE. Atualmente, o painel contém dados de PHE de 74 alimentos *in natura* e mais de 2.000 produtos industrializados.

Disponer dessas informações, sobre a quantidade de PHE presente em alimentos, é essencial para contribuir com o controle de níveis séricos de PHE e, conseqüentemente, visa uma melhora na terapia nutricional e a integração social desses indivíduos. Portanto, esse painel serve de guia e de referência aos profissionais de saúde que prescrevem, elaboram dietas e realizam o acompanhamento clínico desses pacientes (ANVISA, 2012).

### **3.3 Metodologia Analítica**

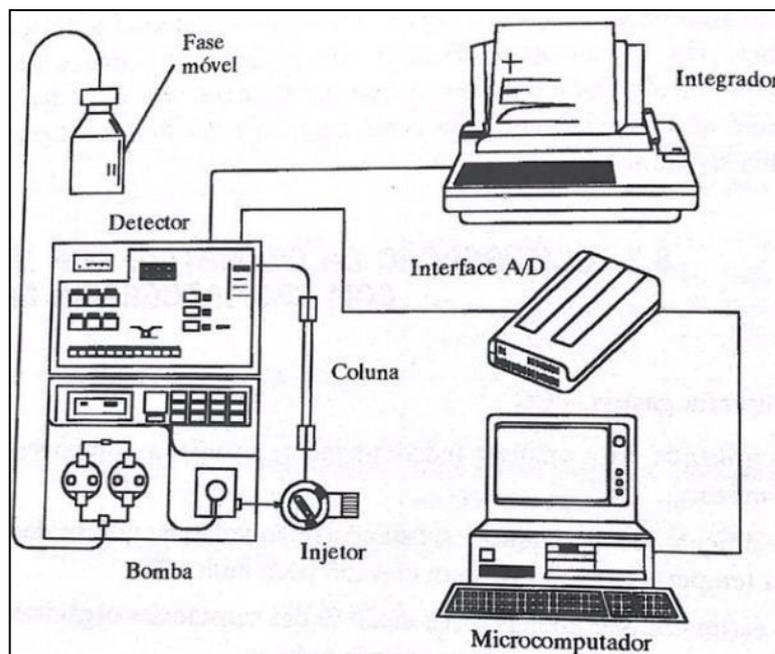
#### **3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. (COLLINS et al., 2006).

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas em diferentes tipos de laboratórios, como farmacêutico, químico e bioquímico, dentre outros. A CLAE utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. A separação dos componentes da mistura ocorre na coluna cromatográfica. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. A detecção contínua e com grande reprodutibilidade na CLAE eleva ambas as análises, quantitativa e qualitativa, a um alto nível de exatidão e precisão (COLLINS et al., 2006).

Um sistema básico de CLAE, consta das partes indicadas no esquema da **Figura 2**.

**Figura 2.** Sistema básico de CLAE.



Fonte: CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000.

### 3.3.2 Detector Ultravioleta

O detector cromatográfico é a parte do equipamento responsável por transformar um atributo físico ou químico, do soluto ou da fase móvel, em um sinal mensurável correspondente à concentração ou identidade (SWARTZ, 2010).

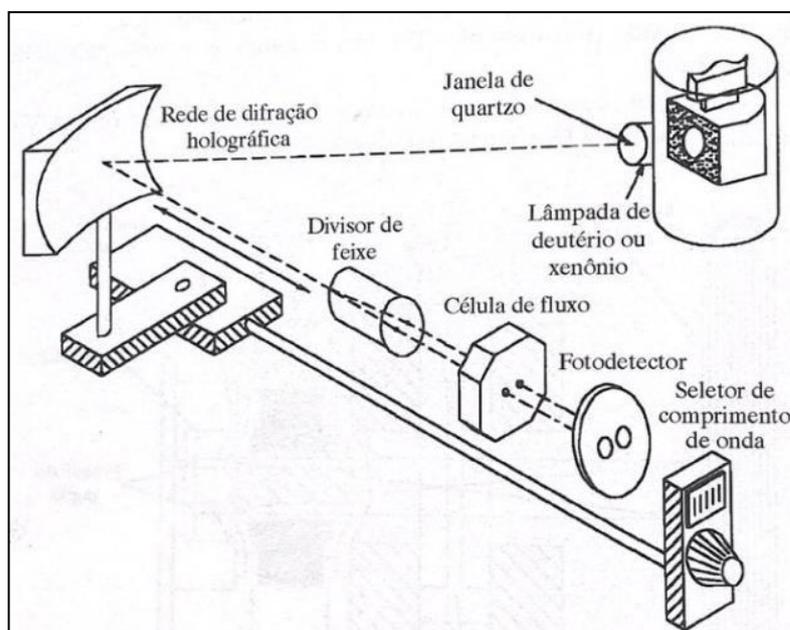
Para a escolha de um detector devem ser considerados critérios como: sensibilidade, detectabilidade, linearidade, repetibilidade, forma do pico, vazão, temperatura e facilidade de operação (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

O detector UV responde a analitos que absorvem na luz UV em um determinado comprimento de onda. Os detectores de UV são geralmente considerados como específicos, respondendo apenas a compostos com cromóforos (SWARTZ, 2010). Pode-se definir como cromóforo uma substância que tem muitos elétrons capazes de absorver energia ou luz visível, e excitar-se para assim emitir diversas cores, dependendo dos comprimentos de onda da energia emitida pelo câmbio de nível energético dos elétrons, de estado excitado a estado basal.

Os detectores de UV podem ser de comprimento de onda fixo; comprimento de onda variável e de arranjo de diodos (DAD – Diode Array Detector).

Neste trabalho, o tipo de detector utilizado foi o UV de comprimento de onda variável. Esse tipo de detector consiste de um monocromador em conjunto com um espectro de luz contínua, lâmpada de deutério ou xenônio. Esse sistema fornece uma seleção infinita de comprimento de onda e, conseqüentemente, aumenta o universo de um detector (**Figura 3**).

**Figura 3.** Detector UV de comprimento de onda fixo.



Fonte: CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000.

A concentração da amostra na célula de fluxo está relacionada com a fração de luz transmitida da célula de acordo com a Lei de Beer. Essa lei estabelece relação entre transmitância, espessura da amostra e concentração das espécies que absorvem, através da seguinte equação (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000):

$$\log_{10}(I_0/I) = kcb = A$$

Onde:

I = luz transmitida;

$I_0$  = luz incidente;

k = constante característica do soluto;

c = concentração do soluto;

b = comprimento do caminho óptico através da amostra;

A = absorvância.

### 3.4 Derivatização

A derivatização consiste basicamente de uma reação química de modificação de compostos a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas. Como a maioria dos aminoácidos não possui capacidade de absorção de ultravioleta ou fluorescência,

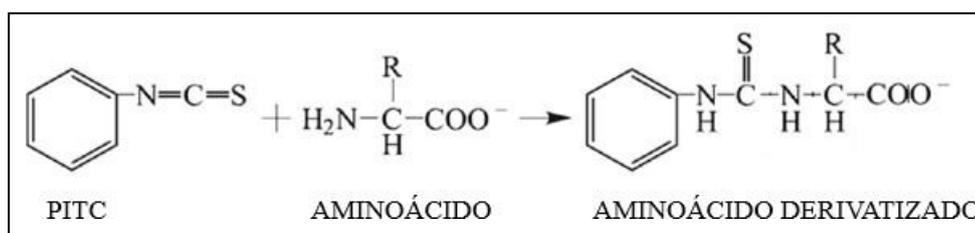
sua análise geralmente requer uma etapa de derivatização. Assim, a derivatização pode ser explorada para uma análise mais sensível e seletiva de aminoácidos (ZHENG et. al., 2015).

Essa etapa de derivatização pode ser realizada pré ou pós-coluna. A derivatização pré-coluna deve satisfazer algumas condições, tais como boa estabilidade e compatibilidade do reagente de derivatização com a fase móvel; sem precipitação ou geração de gás durante a reação de derivatização; e boa solubilidade na fase móvel (PALOMINO-VASCO et al., 2019).

Diferentes reagentes têm sido utilizados como agentes de derivatização, como cloreto de dansila, o-ftalaldeído, 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, fenilisotiocianato (PITC) como derivados de feniltio-hidantoína, 9-Fluorenilmetoxycarbonilcloreto e 2,4-dinitroclorobenzeno.

O PITC é um reagente comum de derivação pré-coluna que tem sido amplamente utilizado para detectar aminoácidos em sucos de laranja, vinho, vinagre, feijão verde, algas comestíveis, tumores cerebrais humanos e ouriços-do-mar (ZHENG et.al., 2015). O PITC tem como vantagem a capacidade de derivatizar aminas primárias e secundárias (SPANO et al., 2009). Além disso, os derivados do PITC são estáveis e facilmente detectável na região UV (SPANO et al., 2009). A reação do PITC com aminoácidos (**Figura 4**) leva apenas 10 a 20 minutos, após os quais, o excesso de reagentes pode ser facilmente removido sem interferir na sensibilidade de detecção (ZHENG et.al., 2015).

**Figura 4.** Reação química do reagente derivatizante PITC com aminoácido.



Fonte: Adaptado de ZHENG et. al., 2015

### 3.5 Validação de metodologia analítica

Validação do método é basicamente o processo de definir um requisito analítico e confirmar que o método em consideração tem recursos consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM, 2014). Portanto, a validação do método é um requisito importante na prática da análise química. Para comprovar que os métodos são adequados para uma determinada finalidade, o laboratório deve validar: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos

para os quais foram concebidos; ampliações e modificações de métodos normalizados (ISO/IEC 17025).

O processo de validação de um método deve estar descrito em um relatório de validação, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados (INMETRO, 2020). Também é de suma importância que o analista responsável pela realização dos estudos tenha conhecimento suficiente e seja competente, uma vez que, os resultados fornecidos por ele têm grande impacto na sociedade. Por exemplo, testes que demonstrem que os alimentos são impróprios para consumo podem resultar em pedidos de indenização; testes que confirmem a presença de drogas proibidas podem resultar em multas, prisão ou mesmo, em alguns países, execução (EURACHEM, 2014).

Os parâmetros de desempenho devem estar claramente descritos no procedimento e relatório de validação e devem incluir, quando aplicável (INMETRO, 2020):

- Seletividade
- Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade
- Limite de Detecção (LOD)
- Limite de Quantificação (LOQ)
- Tendência/Recuperação
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)

### **3.5.1 Seletividade**

A seletividade analítica refere-se à medida em que o método pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferência de outros componentes de comportamento similar (EURACHEM, 2014).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2020).

Uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse, injetando um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada (LANÇAS, 2004). Deve-se ainda demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o componente, ou

seja, é realmente o analito analisado. Isso é importante em decorrência da possibilidade de co-eluição do composto com outros interferentes, principalmente em análises contendo muitos compostos (LANÇAS, 2004).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente, a magnitude desse efeito também pode depender da concentração. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz (INMETRO, 2020).

O procedimento adotado para o estudo do efeito de matriz depende da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Caso não haja disponibilidade da matriz sem o analito, deve-se preparar duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra (que já contém um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz de amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas, preparadas de modo independente, por nível. Para resultado comparam-se as inclinações (coeficientes angulares) das curvas analíticas obtidas. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz, o que pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz. O tratamento estatístico aplicado é o Teste *t* (*Student*) para inclinações das curvas (INMETRO, 2020).

Uma vez identificada a presença de efeito matriz, o método de adição-padrão deve ser empregado.

### 3.5.2 Linearidade

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2020). Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. A variável independente (eixo horizontal ou *x*) relaciona-se às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a dependente (eixo vertical ou *y*), ao sinal analítico obtido para cada concentração do padrão (LANÇAS, 2004).

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação (LOQ). No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2020). A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2020).

A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa. A adição de um padrão interno a cada solução do padrão analítico consiste a corrigir possíveis desvios durante o procedimento analítico, por exemplo, variações no volume de injeção entre uma concentração e outra, no caso de um método cromatográfico (LANÇAS, 2004)

São necessários no mínimo cinco níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida para construir a curva analítica. O número de replicatas analisadas de cada concentração deve ser de no mínimo três, e, preferencialmente, com os níveis de concentração analisados em ordem aleatória (INMETRO, 2020).

Os gráficos de calibração devem ser apresentados com a equação da reta, a análise de regressão e os dados de correlação e determinação (LANÇAS, 2004).

A equação da reta é determinada utilizando a seguinte equação:

$$y = ax + b$$

em que:

$y$  = variável dependente

$x$  = variável independente

$a$  = coeficiente angular

$b$  = coeficiente linear

A regressão linear é determinada pelo método dos mínimos quadrados. A correlação é, normalmente, calculada por intermédio do coeficiente  $r$  de Pearson, ou pelo coeficiente de determinação,  $r^2$  (LANÇAS, 2004)

Entretanto, a linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados. A

verificação da ausência de valores aberrantes pode ser feita pelo teste de Grubbs ou com base nos resíduos padronizados Jackknife. A homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pode ser feita pelos testes de Cochran, de Levene ou de Brown-Forsythe (INMETRO, 2020).

### **3.5.3 Limite de Detecção**

LOD de um procedimento analítico corresponde a menor quantidade de um analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (INMETRO, 2020).

Na prática é importante conhecer a concentração mais baixa do analito que pode ser detectada pelo método em um nível de confiança especificado (EURACHEM, 2014), ou seja, a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança (LANÇAS, 2004). O LOD para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico.

Uma abordagem comum para avaliação do LOD é através da relação sinal/ruído. A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. Uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para a estimativa do limite de detecção. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido (INMETRO, 2020).

Existem outros modos de se calcular o LOD, como por exemplo, por uma avaliação/percepção visual, por estimativa a partir da curva analítica ou pelo desvio padrão do branco ou por meio de curva de desvios padrão.

### **3.5.4 Limite de Quantificação**

O LOQ de um procedimento analítico corresponde a menor quantidade de um analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2020).

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A relação sinal/ruído típica para a estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Também podem

ser adotadas relações sinal/ruído de 6:1 e 5:1, em função do método. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido (INMETRO, 2020).

Assim como o LOD, o LOQ pode ser calculado por uma avaliação/percepção visual, por estimativa a partir da curva analítica ou pelo desvio padrão do branco ou por meio de curva de desvios padrão.

### 3.5.5 Tendência/Recuperação

Para avaliar a tendência de um método normalmente se utiliza de ensaios de recuperação. A recuperação é uma medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente (LANÇAS, 2004).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (INMETRO, 2020).

A recuperação é calculada segundo a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada.

C2: concentração do analito na amostra não fortificada.

C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Os critérios de aceitação para recuperação estão atrelados ao nível de concentração. Na **Tabela 1** abaixo estão os intervalos de acordo com a concentração.

**Tabela 1.** Faixa de aceitação da recuperação.

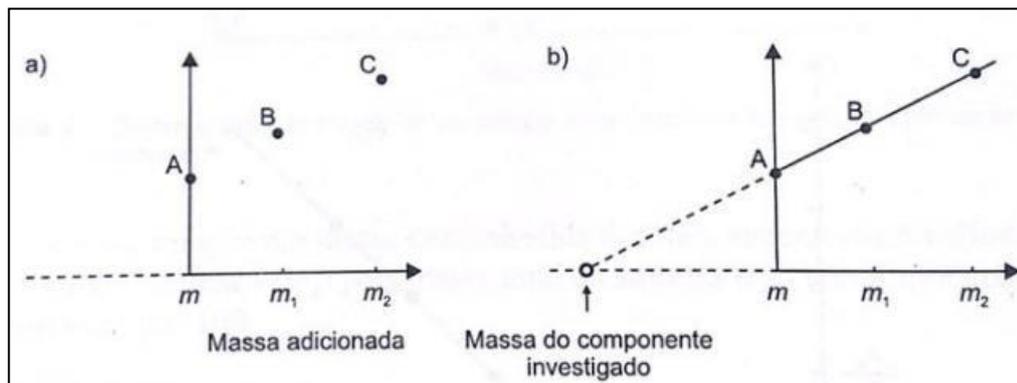
Concentração	Intervalos (%)
$C < 1 \mu\text{g/kg}$	50 a 120
$1 \mu\text{g/kg} \leq C < 10 \mu\text{g/kg}$	70 a 110
$10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$100 \mu\text{g/kg} \leq C < 1.000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$1.000 \mu\text{g/kg} \leq C < 10.000 \mu\text{g/kg}$	80 a 110
$10 \text{mg/kg} \leq C < 100 \text{mg/kg}$	90 a 107
$100 \text{mg/kg} \leq C < 1.000 \text{mg/kg}$	95 a 105
$1.000 \text{mg/kg} \leq C < 10.000 \text{mg/kg}$	97 a 103
$10 \text{g/kg} \leq C < 100 \text{g/kg}$	98 a 102
$100 \text{g/kg} \leq C < 1.000 \text{g/kg}$	98 a 102

Fonte: BRASIL, 2011

### 3.5.5.1 Curva de adição-padrão

Deve-se fazer o uso da curva de adição-padrão quando o laboratório não dispõe de amostras brancas, ou seja, o branco já contém uma certa quantidade do analito. Portanto, a adição-padrão consiste em determinar a massa de um desconhecido, a partir de um gráfico de calibração, por meio da adição sucessiva de quantidades conhecidas do padrão. Inicialmente, determina-se a área do componente desconhecido, por exemplo A, e lança-se esse valor no eixo das ordenadas. Uma massa conhecida do analito, por exemplo  $m_1$ , é adicionada. A nova área obtida B, é lançada no gráfico, sendo, em seguida, efetuada nova adição,  $m_2$ , obtendo-se a nova área, C (**Figura 5a**). Plota a melhor linha reta entre todos os pontos e extrapola até o lado esquerdo do eixo das massas (**Figura 5b**). O valor obtido nesta interseção será a massa do composto na amostra original (LANÇAS, 2004).

**Figura 5.** Curva de calibração por método de adição-padrão. (a) construção do gráfico de calibração. (b) determinação da massa por extrapolação.



Fonte: LANÇAS, 2004.

### 3.5.6 Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). As três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2020).

O coeficiente de variação (CV), usualmente expresso em %, também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$CV = DPR = (DP/CMD) \times 100$$

Sendo:

- DP é o desvio padrão;
- CMD é a concentração média determinada.

Em cromatografia, a precisão é sempre determinada por intermédio da injeção de padrões analíticos (LANÇAS, 2004).

#### 3.5.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade é obtida nas mesmas condições operacionais, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2020).

Em análises cromatográficas é importante conhecer a repetibilidade de pelo menos dois parâmetros: o tempo de retenção e a área ou altura do pico (LANÇAS, 2004).

As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. É importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho, com um número mínimo de repetições, para cada nível de concentração, entre 6 e 15 por material usado no estudo (INMETRO, 2020).

Os critérios de aceitação para a repetibilidade estão apresentados na **Tabela 2**:

**Tabela 2.** Critérios de aceitação para repetibilidade.

Concentração	Coefficiente de Variação (%)
$C < 1 \mu\text{g/kg}$	35
$1 \mu\text{g/kg} \leq C < 10 \mu\text{g/kg}$	30
$10 \mu\text{g/kg} \leq C < 100 \mu\text{g/kg}$	20
$100 \mu\text{g/kg} \leq C < 1.000 \mu\text{g/kg}$	15
$1.000 \mu\text{g/kg} \leq C < 10.000 \mu\text{g/kg}$	10
$10 \text{mg/kg} \leq C < 100 \text{mg/kg}$	7,3
$100 \text{mg/kg} \leq C < 1.000 \text{mg/kg}$	5,3
$1.000 \text{mg/kg} \leq C < 10.000 \text{mg/kg}$	3,7
$10 \text{g/kg} \leq C < 100 \text{g/kg}$	2,7
$100 \text{g/kg} \leq C < 1.000 \text{g/kg}$	2,0

Fonte: BRASIL, 2011

### 3.5.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se as variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças, como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes dias (INMETRO, 2020).

Um método simplificado para estimar a precisão intermediária baseia-se na execução de  $n$  medições ( $n \geq 15$ ), em condições predefinidas, sobre (INMETRO, 2020):

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idênticas;
- padrões.

A estimativa da precisão intermediária (Si), neste caso, é dada pela equação (INMETRO, 2020):

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - y)^2}$$

Si (j,k) é o desvio padrão de precisão intermediária relativo a esse grupo, onde os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parênteses (Ex: Si (T.O) significa tempo e operadores diferentes).

Sendo:

n = nº de ensaios efetuados por amostra ou padrão;

y<sub>k</sub> = cada resultado obtido;

y = representa a média aritmética de cada resultado obtido.

### 3.5.6.3 Limite da precisão

A partir do desvio padrão (s) é útil calcular os limites de precisão. Isso permitirá ao analista decidir quando há uma diferença significativa, a um determinado nível de confiança, entre os resultados de análises duplicadas de uma amostra obtida sob condições especificadas.

O limite de repetibilidade (r) é calculado conforme a equação:

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot sr$$

Onde o fator  $\sqrt{2}$  reflete a diferença entre 2 medições, t é o valor da abscissa da distribuição t (Student) bilateral para determinado número de graus de liberdade (relacionados à estimativa do desvio padrão da repetibilidade (sr)) e nível de confiança. Para graus de liberdade relativamente altos, t é aproximadamente igual a 2 para 95,35% de confiança; assim, o limite de repetibilidade é frequentemente aproximado como:

$$r = 2,8 \cdot sr$$

O limite de precisão intermediária é calculado de maneira similar, substituindo sr por si (EURACHEM, 2014).

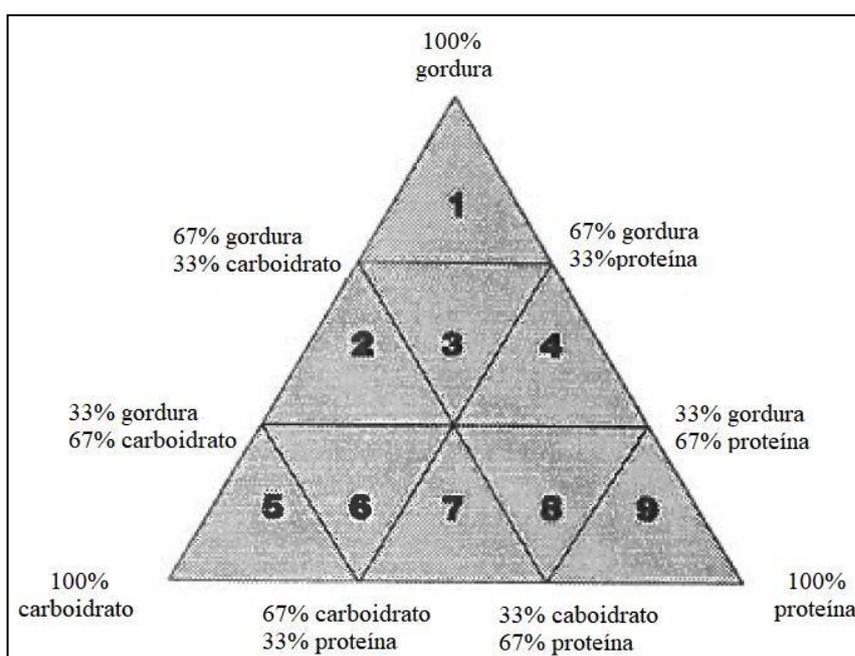
### 3.6 Triângulo de Composição de Alimentos AOAC

O Subcomitê de Definição de Alimentos da Força-Tarefa da AOAC sobre métodos para rotulagem de nutrientes analisa abordagens sistemáticas para validar métodos analíticos aplicáveis a todos os alimentos e produtos alimentícios. Este relatório do Subcomitê descreve um sistema que reflete melhor como os alimentos variam com base química e não com base em commodities, reduzindo assim o número de amostras, isso representaria todos os alimentos em um número gerenciável (AOAC, 1993).

O comportamento de um determinado alimento em um método analítico é determinado principalmente pelas proporções relativas de proteínas, gorduras e carboidratos (SHARPLESS *et. al.*, 2004). Com base nisso, a AOAC desenvolveu um sistema organizacional de matriz alimentar baseado na composição macro de matrizes alimentares para demonstrar a aplicabilidade de um método analítico a uma variedade de alimentos (AOAC, 1993; WISE; PHILLIPS, 2019). Cada vértice, do Triângulo de Composição de Alimentos AOAC, representa 100% de suas proteínas, gorduras e carboidratos e, ainda, é dividido em nove setores que servem para agrupar os alimentos de acordo com sua composição química básica (**Figura 6**).

Dessa forma, foi definido que ao selecionar dois alimentos ou produtos alimentares dentro de um setor, esses alimentos são representativos para outros alimentos dentro desse setor, ou seja, se um método analítico fornecer resultados precisos para os alimentos testados, também deve fornecer resultados precisos para os outros alimentos do mesmo setor (AOAC, 1993).

**Figura 6.** Esquema do triângulo da AOAC baseado no teor de proteína, gordura e carboidrato.



Fonte: AOAC, 1993.

### 3.7 Farinha de Trigo

O trigo, pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Pooideae* e ao gênero *Triticum*, é classificado em diferentes espécies, conforme o número de cromossomos: *Triticum monococcum* com 14 cromossomos, *Triticum durum* com 28 cromossomos e *Triticum aestivum* com 42 cromossomos (SCHEUER et. al., 2011). A Instrução Normativa 8/2005 do MAPA institui que as farinhas de trigo devem ser produzidas a partir do trigo do gênero *Triticum aestivum* L. ou outras espécies de gênero *Triticum* (MENEZES, 2020). As diferentes variedades se distinguem pela altura das plantas, produtividade, conteúdo de endosperma, proporção de proteínas na farinha, qualidade da proteína, resistência a diversas doenças e adaptabilidade a solos ácidos, requerimentos climatológicos e pela aparência física (SCHEUER et. al., 2011).

O grão do trigo tem cor e tamanho variáveis, mas, geralmente, apresenta formato ovalado com extremidades arredondadas, sendo composto basicamente por três partes: o gérmen (rico em proteínas e lipídios), a casca (rica em fibras, minerais e vitaminas) e o endosperma (rico em amido) (AGEITEC, 2022). Como os constituintes não se distribuem uniformemente no grão, isto leva a características e propriedades diferentes dos produtos derivados do trigo, em especial, da farinha. À proporção que se aumenta a taxa de extração da farinha, há um pequeno ganho em proteína e maior ganho em cálcio e ferro (AGEITEC, 2022). Para a substituição de alguns nutrientes perdidos na moagem, a farinha é, com frequência, enriquecida pela adição de tiamina, riboflavina, niacina, ferro e ácido fólico. Inclusive, a partir de 2004, o governo federal determinou que todas as farinhas de trigo fabricadas no país ou importadas fossem enriquecidas com ferro e ácido fólico (EMBRAPA, 2009).

A farinha de trigo é obtida através do processo de moagem do grão do trigo, resultando numa proporção de 75% em relação ao peso total. Os 25% restantes correspondem ao farelo de trigo (MENEZES, 2020). De forma geral, a farinha de trigo é composta sobretudo de amido (70 a 75%), água (12 a 14%), proteínas (8 a 16%) e outros constituintes menores, como polissacarídeos não amiláceos (2 a 3%), lipídeos (2%) e cinzas (1%) (SCHEUER et. al., 2011).

No mercado existem as farinhas de trigo Tipo 1, farinha de trigo Tipo 2 e as farinhas de trigo integrais. A farinha de trigo Tipo 1 é produzida a partir da moagem do miolo do grão com o mínimo de farelo e contém carboidratos e proteínas. Esta farinha é indicada para a preparação de pães, bolos e confeitaria em geral, além de massas, como macarrão, pastel, pizza e folhadas. A farinha de trigo Tipo 2 é extraída da parte mais externa do grão do trigo e apresenta uma coloração mais escura e amarelada, é utilizada para a confecção de biscoitos com ou sem recheio e cookies. Por fim, a farinha de trigo integral é elaborada a partir da moagem do grão

completo. Por este motivo, possui alta quantidade de fibras que promovem maior absorção de água. Esta farinha é indicada para massas mais consistentes como pão integral e pão de centeio, bolos de frutas e cereais (MENEZES, 2020).

Por fim, a farinha de trigo é uma matéria-prima abundantemente utilizada para elaboração de diversos alimentos, como pães, biscoitos, bolos e massas, que são consumidos diariamente e que fazem parte da base da pirâmide alimentar, cujo consumo é incentivado pelo Guia Alimentar da População Brasileira (SCHEUER et. al., 2011).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Microcomponentes (LAM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esse laboratório faz parte do Serviço de Química Especializada que pertence à Divisão de Vigilância Sanitária (DIVISA), ligada ao Instituto Octávio Magalhães (IOM). Este Instituto é o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG), responsável por realizar as atividades referentes à Vigilância Sanitária e Epidemiológica no Estado.

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Reagentes**

Os reagentes acetonitrila e metanol, ambos grau HPLC, foram obtidos da marca J.T.Baker. O agente derivatizante, fenilisotiocianato (PITC) e o ácido fosfórico (solução 50%) foram adquiridos da marca Sigma Aldrich. Da marca Merck foram utilizados o ácido acético glacial, fenol e hidrogeno fosfato dissódico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Ácido clorídrico 37% foi adquirido da marca Neon. O acetato de sódio trihidratado foi obtido da marca Biograde. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico foi adquirido da marca Química Moderna. Da marca Vetec foi usado o hidróxido de sódio. A trietilamina foi adquirida da marca Êxodo Científica. O padrão de aminoácidos utilizado consiste de uma solução com uma mistura de 17 aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina) e amônia em HCl 0,1N, cada aminoácido na concentração de  $2.5 \pm 0.1 \mu\text{Mol/mL}$ , exceto cistina com concentração de  $1.25 \pm 0.1 \mu\text{Mol/mL}$ , que foi adquirido da marca Thermo Scientific (Amino Acid Standard H). Também foram utilizados padrões individuais de aminoácidos da marca Fluka.

#### 4.1.2 Vidrarias

As vidrarias utilizadas foram balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mL, bastões de vidro, béquer de 50, 100, 250, 1000 e 2000 mL, eppendorff de 2 mL, espátulas, estante para tubo de ensaio, frascos de vidro âmbar de 100, 1000 e 4000 ml com tampa, kit de filtração (kitassato, bomba à vácuo, membrana filtrante de celulose regenerada 0,45  $\mu\text{m}$ , filtro e copo de filtração), pipeta de pasteur de vidro ponta longa, pisseta, provetas graduadas de 50, 100, 500 e 1000 mL, seringas de 5 mL, filtro de celulose regenerada 0,45  $\mu\text{m}$  para seringa, tubo de ensaio (diferentes tamanhos), tamis com abertura de 0,42 mm e *mesh* 35, tubo de hidrólise de 20 mL e vial.

#### 4.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram agitador de tubos marca IKA, modelo MS2, com velocidade de 2000 rpm, banho ultrassom marca Ultronique, modelo Q3.0/40A, balança analítica marca Scientech, modelo SA210, bloco digestor marca Quimis, modelo Q327.A242, bomba de vácuo à óleo marca Edwards, modelo PM13226-840, capela de exaustão química marca Buzzatos, centrífuga marca Jouan, modelo CR3i multifunction, cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu; cronômetro ou timer, evaporadora rotativa marca Jouan, modelo RC1010, acoplada a uma armadilha fria da marca Jouan, modelo RCT90 e uma bomba de vácuo à óleo da marca Edwards, geladeira, pHmetro marca Digimed, modelo DM-20, pipetas automáticas (10-50  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ ; 100-1000  $\mu\text{L}$ ; 0,5-5mL; 1-10mL), Purificador de água Milli-Q marca Millipore, modelo Milli-Q Academic.

#### 4.1.4 Amostra

A amostra de farinha de trigo foi obtida em um supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O pacote de 1 Kg de farinha de trigo tipo I foi amostrado aleatoriamente. A amostra foi devidamente homogeneizadas, por quarteamento, e peneiradas em tamis com *mesh* 35. Posteriormente foi armazenada em frascos de plásticos, devidamente identificados e hermeticamente fechados.

#### 4.2 Preparo das soluções

As soluções utilizadas para a hidrólise da proteína, derivatização dos aminoácidos, as fases móveis e soluções dos padrões para as etapas da validação estão descritas abaixo:

## **4.2.1 Solução para hidrólise ácida das proteínas**

### **4.2.1.1 Solução de ácido clorídrico 6 M com fenol**

Foram medidos em uma proveta graduada, 502 mL de água ultrapura e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL que estava previamente em banho de gelo. Adicionaram-se cerca de  $3 \pm 0,1$ g de fenol e o volume foi completado com ácido clorídrico 37%. Essa solução ficou armazenada em freezer  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **4.2.2 Soluções para a derivatização dos aminoácidos**

### **4.2.2.1 Solução de acetato de sódio trihidratado 0,2 M**

Foram pesados, com exatidão, cerca de  $27,2 \pm 0,1$ g de acetato de sódio trihidratado a 99,0-101,0% que foram dissolvidos com água ultrapura em um béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou o volume com água ultrapura. Filtrou em membrana de filtração de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ .

### **4.2.2.2 Solução de re-secagem**

Foram medidos em uma proveta graduada de 50 mL, 40 mL de acetato de sódio trihidratado 0,2 M, 20 mL de trietilamina a 99%, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e completou com metanol a 99,7-100% grau CLAE

### **4.2.2.3 Solução derivatizante sem PITC**

Foram medidos em uma proveta graduada de 100 mL, 70 mL de metanol a 99,7-100% grau CLAE e transferido para um frasco de 100 mL com tampa. Adicionaram 10 mL de água ultrapura e 10 mL de trietilamina a 99%, medidos com pipeta automática. Homogeneizou-se a solução e estocou em geladeira com temperatura inferior a  $10^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2.2.4 Solução derivatizante com PITC**

Foi medida, com pipeta automática, quantidade de solução derivatizante sem PITC e do reagente derivatizante PITC que foram transferidos para um eppendorf de 2 mL e agitados em agitador de tubos. A quantidade adicionada do reagente derivatizante PITC é 10% do volume total da solução. Essa solução sempre foi preparada no momento do uso e os volumes pipetados variavam de acordo com a quantidade de amostras. Sabendo que o volume pipetado dessa

solução para cada amostra é 22  $\mu\text{L}$ , seguem alguns exemplos das quantidades pipetadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Preparo da solução derivatizante com PITC.

Nº de amostras	Solução derivatizante sem PITC ( $\mu\text{L}$ )	PITC 99,5-100% ( $\mu\text{L}$ )	Volume total ( $\mu\text{L}$ )
05	99	11	110
10	198	22	220
15	297	33	330
20	396	44	440
25	495	55	550

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: PITC: fenilostiocianato

#### 4.2.2.5 Solução de ácido fosfórico a 10% v/v

Foram medidos em uma proveta graduada, 160 mL de água ultrapura e transferiu para um balão volumétrico de 200 mL. Completou o volume com solução de ácido fosfórico 50%. Filtrou em membrana de filtração de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.6 Solução diluente

Pesou, com exatidão, cerca de 0,3762 g ( $\pm 0,0003$  g) de hidrogeno fosfato dissódico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a 99,0-100% e dissolveu com água ultrapura em um béquer de 250 mL. Deixou no ultrassom por 5 minutos. Transferiu para balão volumétrico de 1000 mL e completou o volume com água ultrapura. Transferiu a solução para um béquer de 1000 mL e ajustou o pH com ácido fosfórico a 10% até pH 7,40. Adicionaram 5 mL de acetonitrila a 99,7-100% grau CLAE. Filtrou em membrana de filtração de 0,45  $\mu\text{m}$  e estocou em geladeira com temperatura inferior a 10  $^\circ\text{C}$ .

### 4.2.3 Soluções para análise cromatográfica

#### 4.2.3.1 EDTA dissódico 2g/L

Foi pesado, com exatidão, cerca de 0,2 g  $\pm 0,0003$  g de EDTA dissódico a 99,0-100%, transferiu para balão volumétrico de 100 mL, completou o volume com água ultrapura e filtrou

em membrana de filtração 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.3.2 Solução de ácido acético 1 M**

Em uma proveta foram medidos 5,75 mL de ácido acético glacial e transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

#### **4.2.3.3 Solução de hidróxido de sódio 0,5 M**

Foram pesados, com exatidão, cerca de 10 g de hidróxido de sódio e solubilizado com água ultrapura. Foi transferido para um balão de 500 mL e o volume completado com água ultrapura.

#### **4.2.3.4 Fase móvel A**

Foram pesados, com exatidão, cerca de 4,9259  $\pm$ 0,0001 g de acetato de sódio trihidratado a 99,0-101,0% em um béquer de 250 mL e foi transferido para um béquer de 1000 mL diluindo com aproximadamente 800 mL de água ultrapura. Adicionaram-se 400  $\mu\text{L}$  de EDTA dissódico 2g/L com uma pipeta automática. Ajustou o pH dessa solução para 6,60 com auxílio de uma solução de ácido acético 0,1M e/ou hidróxido de sódio 0,05M. Transferiu todo o volume para um balão volumétrico de 1000mL, completou o volume com água ultrapura e homogeneizou. Filtrou em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.3.5 Fase móvel B**

Acetonitrila.

### **4.2.4 Soluções utilizadas para análise da seletividade**

#### **4.2.4.1 Solução de ácido clorídrico 0,1M**

Foram diluídos 8,4 mL de ácido clorídrico 37% para um volume final de 1000 mL com água ultrapura em balão volumétrico.

#### 4.2.4.2 Solução padrão dos aminoácidos individuais 2,5 $\mu\text{mol/mL}$

Os padrões de aminoácidos foram pesados e diluídos em solução de ácido clorídrico 0,1 M. Cada padrão foi transferido para balões de 50 mL. As massas correspondentes para a concentração final de 2,5  $\mu\text{mol/mL}$  de cada padrão de aminoácido, exceto para a cistina que a concentração final foi de 1,25  $\mu\text{mol/mL}$ , estão na **Tabela 4**. Os cálculos foram feitos baseado na massa molar de cada aminoácido.

**Tabela 4.** Massa correspondente para concentração final de 2,5  $\mu\text{mol/mL}$  de cada padrão de aminoácido, exceto para a cistina que a concentração final foi de 1,25  $\mu\text{mol/mL}$ .

Aminoácido	Massa (mg)
ácido aspártico	16,6388
ácido glutâmico	18,3913
alanina	11,1363
arginina	26,3325
cistina	15,0188
fenilalanina	20,6488
glicina	9,3838
histidina	23,9513
isoleucina	16,3963
leucina	16,3963
lisina	18,2738
metionina	18,6513
prolina	14,3913
serina	13,1363
treonina	14,8899
tirosina	22,6488
valina	14,6439
asparagina	16,5150
triptofano	25,5288
cisteína	15,6450
hidroxiprolina	16,3913
glutamina	18,2675

Fonte: Elaborado pela autora

## **4.2.5 Soluções utilizadas para linearidade e efeito matriz**

### **4.2.5.1 Solução intermediária do padrão de aminoácido 100 nmol/mL**

Uma ampola de 1 mL do padrão de aminoácido (Amino Acid Standard H) foi adicionada em um balão de 25 mL. O volume foi completado com solução de ácido clorídrico 0,1M.

### **4.2.5.2 Curva de calibração em solvente (0,20; 0,35; 0,50; 0,65; 0,80; 0,95 nmol/mL)**

Alíquotas de 100, 175, 250, 325, 400 e 475  $\mu\text{L}$  da solução intermediária de padrão de aminoácidos 100 nmol/mL foram pipetadas para balões de 5 mL, respectivamente. O volume foi completado com solução de ácido clorídrico 0,1 M. Também foi feito o branco de solvente. Todas essas soluções foram filtradas em filtro de celulose regenerada 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.5.3 Extrato de farinha de trigo hidrolisada**

Foi pesado 0,1653 g de farinha de trigo tipo I no tubo de hidrólise. Foi realizada a hidrólise da farinha conforme o item 4.3.1. Após, a farinha hidrolisada foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. O tubo de hidrolisado foi lavado três vezes com água ultrapura. O volume do balão foi completado com água ultrapura e homogeneizou vigorosamente.

### **4.2.5.4 Curva de calibração matrizada**

Alíquotas de 100, 175, 250, 325, 400 e 475  $\mu\text{L}$  da solução intermediária de padrão de aminoácidos 100 nmol/mL foram pipetadas para balões de 5 mL, respectivamente. Foi adicionado ainda 1,0 mL de extrato de farinha de trigo hidrolisada. O volume foi completado com solução de ácido clorídrico 0,1 M. Também foi feito o branco de amostra. Todas essas soluções foram filtradas em filtro de celulose regenerada 0,45  $\mu\text{m}$ .

## **4.2.6 Soluções utilizadas para precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e recuperação**

### **4.2.6.1 Solução padrão de Phe 0,05 mmol/mL**

Foram pesadas, com exatidão, cerca de 413 mg de padrão de fenilalanina e diluída com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M. Foi transferido para um balão de 50 mL e o volume completado com solução de ácido clorídrico 0,1 M.

### **4.2.7 Soluções utilizadas para limite de detecção e quantificação**

As soluções de concentração de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 2,5 e 3,0 nmol/mL foram preparadas a partir da solução intermediária do padrão de aminoácido 100 nmol/mL (item 4.2.5.1). As soluções preparadas são dez vezes mais concentradas pois na etapa de derivatização ocorre uma diluição de dez vezes. Para as soluções de 30, 25, 20, 10, 7,5, 5,0, 2,5 e 1,0 nmol/ml foram pipetados 1,5, 1,25, 1,0, 0,5, 0,375, 0,25, 0,125 e 0,05 mL da solução intermediária 100 nmol/mL. Já para as soluções 0,75, 0,5, 0,25 e 0,1 nmol/mL foram pipetados 0,375, 0,250, 0,125 e 0,05 ml da solução de 10 nmol/mL.

## **4.3 Métodos**

### **4.3.1 Hidrólise da proteína presente na amostra**

Para realizar a hidrólise ácida da proteína das amostras, foi pesado, com exatidão, cerca de 0,1653 g de farinha de trigo diretamente no tubo de hidrólise de 20 mL, tomando cuidado para que não ficasse qualquer resíduo de amostra na porção superior do tubo.

Posteriormente foram adicionados 9 mL de solução de HCl 6 M com fenol gelado (item 4.2.1.1) no tubo de hidrólise, que foi tampado e rosqueado levemente. Conectou-se a saída do tubo à bomba de vácuo e deixou o vácuo ligado durante 10 minutos, para assegurar a total eliminação do oxigênio presente. Fechou o tubo, sem exagerar no aperto. Os tubos foram colocados no bloco digestor de aminoácidos mantendo aquecido a 110 °C por 22 horas. Decorrido esse tempo, retirou-se os tubos do bloco digestor e deixou esfriar à temperatura ambiente.

Após, transferiu-se quantitativamente o conteúdo hidrolisado para balão volumétrico, nos quais os volumes variaram de acordo com cada parâmetro estudado, e lavou bem o tubo

com água destilada. O volume foi completado com água destilada e homogeneizou vigorosamente.

#### 4.3.2 Derivatização dos aminoácidos

Após as diluições realizadas na etapa de hidrólise, retirou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução já filtrada em filtro 0,45  $\mu\text{m}$  e adicionou em tubos de ensaio de vidro. Posteriormente, foram secas na evaporadora rotativa à vácuo a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Após, adicionaram 22 $\mu\text{L}$  de solução de re-secagem, nos tubos de ensaio de vidro homogeneizando em agitador de tubos por 30 segundos. Secou novamente a amostra como descrito na etapa anterior. Posteriormente, adicionaram 22 $\mu\text{L}$  de solução derivatizante com PITC. Homogeneizou em agitador de tubos por 30 segundos e deixou em repouso por 20 minutos. Após o repouso, procedeu novamente a secagem, por 20 minutos. Foi feita a diluição nos próprios tubos de ensaio de vidro com 500 $\mu\text{L}$  de solução diluente. Deixou no ultrassom por 10 minutos. Homogeneizou em agitador de tubos por 15 segundos e centrifugou por 5 minutos a 3000 rpm. Transferiu para o vial com o auxílio de pipeta de pasteur de vidro e injetadas no cromatografo nas condições analíticas citadas no item 4.3.3.

#### 4.3.3 Sistema cromatográfico e condições do método analítico

A análise dos aminoácidos livres foi realizada em cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu, equipado com duas bombas (LC-10ADvp), um desgaseificador (DGU-12AM), um injetor automático (SIL-20A), um forno (CTO-20AC), um detector ultravioleta (SPD-20A), um detector fotodiodo (SPD-M20A) e um comunicador (SCL-10Avp) que faz a interface entre o sistema e o software LC Solution. A coluna utilizada foi da Kromasil com recheio de octadecilssilano (C18) tamanho de poro 100  $\text{\AA}$ , com tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$  e dimensão de 250 x 4,6 mm. A pré coluna foi da marca Merck com fase estacionária de C18, tamanho de poro de 100  $\text{\AA}$ , tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$  e dimensão de 40,0 x 4,0 mm. A coluna e pré coluna foram mantidas numa temperatura de 50  $^{\circ}\text{C}$ . O volume de injeção foi de 50  $\mu\text{L}$  com um fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda utilizado no sistema de detecção UV foi de 254 nm. A fase móvel A é um tampão como descrito no item 4.2.3.4 e fase móvel B é acetonitrila. Os gradientes de eluição das fases móveis estão descritos na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Gradiente de eluição das fases móveis do método cromatográfico.

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
2,5	91,3	8,7
5,0	87,5	12,5
6,0	87,5	12,5
7,5	85,0	15,0
10,0	80,0	20,0
15,0	71,0	29,0
15,50	71,0	29,0
19,00	62,0	38,0
23,0	40,0	60,0
29,0	40,0	60,0
30,0	94,0	6,0
33,0	94,0	6,0
34,0	91,3	8,7
36,0	91,3	8,7

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.3.4 Validação do método analítico

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação do equipamento foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão e amostras-branco contendo o analito. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos. O procedimento de validação adotado foi baseado em um delineamento experimental simples e testes estatísticos robustos.

A aleatoriedade das amostras analisadas na linearidade e no efeito matriz foi definida utilizando Excel modelo X, com a função =ALEATÓRIO e classificada do menor para o maior.

##### 4.3.4.1 Seletividade

Foram preparadas soluções padrões para cada aminoácido na concentração de 2,5  $\mu\text{mol/mL}$ , exceto para a cistina, que foi de 1,25  $\mu\text{mol/mL}$  e também o branco de solventes e injetados individualmente nas condições cromatográficas descritas no item 4.3.3. Foi utilizado além do detector de UV o de arranjo de diiodo (DAD). A seletividade do aminoácido PHE foi

avaliada comparando os tempos de retenção de outros 20 aminoácidos diferentes, sendo eles: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina, triptofano, cisteína, hidroxiprolina e glutamina. Ainda, foi feita uma comparação do espectro de ultravioleta do analito de interesse obtido no DAD com o encontrado na literatura e os cromatogramas dos brancos de solventes avaliados em relação com presença de picos interferentes na região que a PHE elui.

#### 4.3.4.2 Efeito matriz

Para verificação do efeito de matriz foi empregado o método de adição de padrão. Uma curva foi preparada em solvente e a outra com extrato de farinha de trigo hidrolisada. Para a curva do analito na matriz, utilizou-se 1,0 mL do extrato de farinha de trigo hidrolisada conforme o item 4.2.5.3 adicionada de 100; 175; 250; 325; 400 e 475  $\mu\text{L}$  da solução intermediária de padrão de aminoácidos 100 nmol/mL, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico com ácido clorídrico 0,1 M. As amostras foram preparadas em triplicatas independentes. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Desprezou-se as 5 primeiras gotas. Retirou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da amostra filtrada e transferiu para um tubo de ensaio de vidro, para proceder a derivatização (item 4.3.2). Após transferiu-se para o vial com o auxílio de pipeta de pasteur de vidro e foram injetadas no cromatógrafo nas condições analíticas citadas no item 4.3.3. As soluções foram analisadas em ordem aleatória. A curva em solvente foi a utilizada para o estudo da linearidade.

As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade. A interferência da matriz foi investigada pela comparação das inclinações das curvas preparadas em solvente com aquelas obtidas para as curvas matrizadas, pelo teste de t (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

#### 4.3.4.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada conforme procedimentos propostos por Souza & Junqueira (2005). Após os testes para definir a melhor faixa de interesse, a curva de calibração foi preparada uniformemente espaçadas, nos seis níveis de concentração 0,20; 0,35; 0,50; 0,65; 0,80 e 0,95 nmol/mL de PHE em ácido clorídrico a 0,1 M (correspondentes a 49,97; 87,44; 124,92; 162,39; 199,87; 237,34 mg/100g, respectivamente), em triplicatas independentes de cada nível. Para a curva foram pipetadas alíquotas de 100, 175, 250, 325, 400 e 475  $\mu\text{L}$  da

solução intermediária de padrão de aminoácidos 100 nmol/mL para balões de 5 mL, respectivamente. O volume foi completado com solução de ácido clorídrico 0,1 M. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Desprezou-se as 5 primeiras gotas. Retirou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da amostra filtrada e transferiu para um tubo de ensaio de vidro, para proceder a derivatização (item 4.3.2). Após transferiu-se para o vial com o auxílio de pipeta de pasteur de vidro e foram injetadas no cromatógrafo nas condições analíticas citadas no item 4.3.3. Brancos de solvente foram preparados como ferramenta de controle de qualidade interno e ajuste do zero do equipamento. As soluções foram analisadas em ordem aleatória.

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados, sendo que os *outliers* (valores dispersos) foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. As premissas relativas à análise de regressão foram verificadas a normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA). Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade.

#### 4.3.4.4 Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermediária

Como não havia material de referência certificado devidamente caracterizado para PHE em farinha de trigo, para os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) foi utilizada como amostras brancas a farinha de trigo que já contém a PHE. Foram pesadas, nos tubos de hidrólise, cerca de 0,1653 g de farinha de trigo que já contém a PHE. Essas amostras foram fortificadas com padrão de PHE 0,05 mmol/mL (item 4.2.6.1) em três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa linear obtida. Para cada nível de concentração foram adicionados 250, 500 e 900  $\mu\text{L}$  de padrão de PHE 0,05 mmol/mL que corresponde respectivamente a 62,46; 124,92; e 224,85 mg/100g de PHE na farinha de trigo no final do processo. Após, foram hidrolisadas conforme o item 4.3.1. O hidrolisado foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, completou o volume com água destilada e homogeneizou bem. Retirou-se 1,0 mL e transferiu para um balão volumétrico de 5,0 mL e completou o volume com solução de ácido clorídrico 0,1 M. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Desprezou-se as 5 primeiras gotas. Retirou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da amostra filtrada e transferiu para um tubo de ensaio de vidro, para proceder a derivatização

(item 4.3.2). Em seguida, transferiu-se para o vial com o auxílio de pipeta de pasteur de vidro e foram injetadas no cromatógrafo nas condições analíticas citadas no item 4.3.3. Também foram preparados os brancos.

Para cada nível de concentração estudado, foram feitas oito replicatas independentes que foram analisadas em quatro dias diferentes. O analista 2 repetiu essas análises simulando condições de precisão intermediária (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; SANCO, 2012).

Como a quantidade de tubos de hidrólise foi limitada a 7 unidades, o estudo foi conduzido conforme mostrado na **Tabela 6**:

**Tabela 6.** Esquema utilizado para avaliação da precisão e recuperação do método.

Dia	Branco	Nível baixo	Nível médio	Nível alto	
1	1	6			
2	1		6		Analista 1
3	1			6	
4	1	2	2	2	
5	1	6			
6	1		6		Analista 2
7	1			6	
8	1	2	2	2	

Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BARRET; LEWIS, 1994; BURKE, 2001). As estatísticas de Grubbs para um *outlier* ( $G_1$ ), dois *outliers* vicinais ( $G_2$ ) e dois *outliers* polares ( $G_3$ ) foram calculadas simultaneamente para os resultados obtidos no nível de concentração estudado. A indicação de outlier por, pelo menos, uma destas estatísticas seria suficiente para excluir o dado. Após um primeiro ciclo, o teste de Grubbs foi sucessivamente aplicado até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22 % no número original de resultados de recuperação (HORWITZ, 1995).

A inexatidão foi investigada por meio da média de recuperação obtida para as replicatas de amostras adicionadas nos níveis de concentrações estudados, após o diagnóstico de *outliers*. O critério de aceitabilidade adotado foi de média de recuperação entre 80 % a 110 %.

As precisões sob condições de repetitividade e precisão intermediária foram expressas em termos de desvios padrão relativos e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos para as dezesseis replicatas de amostras adicionadas nos níveis de concentração estudado (ISO, 1994; ISO, 1998; KUTTATHARMMKUL; MASSART; SMEYERS-VERBEKE, 1999; MAROTO *et. al.*, 1999). As premissas de normalidade (RYAN; JOINER, 1976) e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação (LEVENE, 1960; BROWN; FORSYTHE, 1974), relativas à análise de variância, foram previamente testadas.

#### **4.3.4.5 Limite de Detecção e Quantificação**

Para determinar os limites de detecção e de quantificação foram injetados o padrão de aminoácido (Standard H), em triplicata, nas seguintes concentrações 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 2,5 e 3,0 nmol/mL. Também foram injetados os brancos de solvente. Assim, os LOD e LOQ foram determinados pela comparação dos sinais medidos do padrão de aminoácido com concentrações conhecidas e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A relação sinal/ruído adotada foi de 3:1 para o LOD e de 10:1 para o LOQ.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Otimização**

#### **5.1.1 Condições cromatográficas**

A otimização da fase móvel é essencial para alcançar simultaneamente boa separação e alta sensibilidade de identificação e quantificação de aminoácidos se a técnica de derivatização de PITC for aplicada. O pH das fases móveis é um atributo considerado crítico para a análise dos aminoácidos.

Inicialmente, as fases móveis utilizadas eram tampões, sendo a fase A constituída de acetato de sódio trihidratado, EDTA e água e a fase B constituída de acetato de sódio

trihidratado, EDTA, água e acetonitrila, ambas com pH 6,60. Com essas fases móveis, o gradiente de concentração do método aplicado está apresentado na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Primeiro gradiente de concentração aplicado.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
5,00	95,00	5,00
10,00	77,50	22,50
11,80	68,00	32,00
20,00	40,00	60,00
23,00	0,00	100,00
29,00	100,00	0,00
29,10	100,00	0,00
35,99	100,00	0,00
36,00	100,00	0,00

Fonte: Elaborado pela autora

Entretanto, não houve separação dos aminoácidos metionina e cistina. Portanto, foi feita alteração do gradiente de concentração para melhorar a resolução desses picos, e foi definido o seguinte gradiente de concentração:

**Tabela 8.** Segundo gradiente de concentração aplicado.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
2,5	95	5
7,5	82	18
11,00	72	28
20,00	40	60
23,00	0	100
29,00	0	100
30,00	100	0
33,00	100	0
34,00	95	5
36,00	95	5

Fonte: Elaborado pela autora

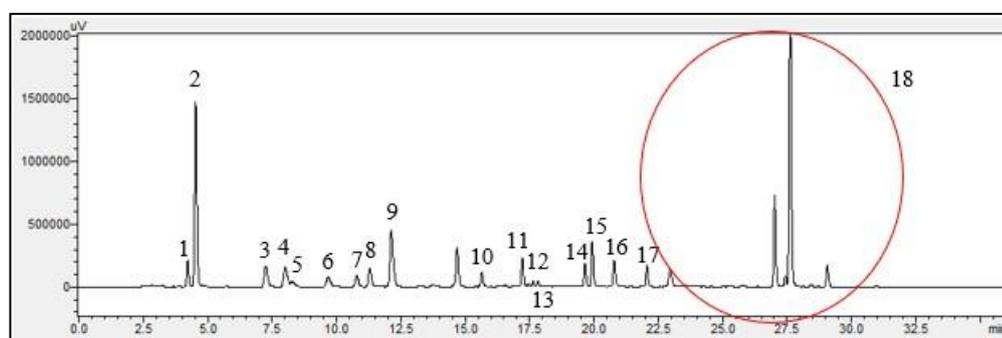
A partir desse método, foram avaliados padrões de aminoácidos para realizar o estudo de validação. Porém, percebeu-se que o método ainda não estava robusto, uma vez que, a cada novo preparo de fases móveis, os picos apresentavam diferentes tempos de retenção. Isso pode ser justificado pelo fato de o eletrodo utilizado para fazer a correção do pH das fases móveis ser específico apenas para soluções aquosas. Como o pH é considerado um fator crítico para a análise de aminoácido, e não havia disponível um eletrodo específico para solvente orgânico, foram alteradas as constituições das fases móveis. Com base nisso, foi definido que a fase móvel B seria constituída apenas de acetonitrila, ou seja, não haveria mais necessidade de ajustar o pH da fase móvel B. Para isso, foi alterada a quantidade de sal de acetado de sódio trihidratado presente na fase A. Após essas mudanças, foi definido o novo gradiente de concentração utilizado na análise de aminoácido (**Tabela 5**).

### 5.1.2 Hidrólise ácida

A hidrólise é uma etapa extremamente importante na análise de aminoácidos, pois afeta significativamente a recuperação de aminoácidos. Dependendo da temperatura e tempo de análise da hidrólise ácida, alguns aminoácidos podem se degradar (JAJIC *et. al*, 2013).

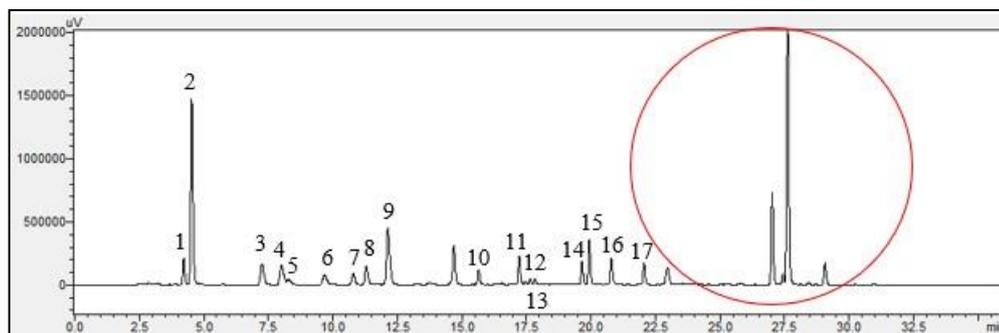
Os testes realizados foram avaliados na temperatura de 150 °C durante 6 hs conforme JAJIC *et. al*. (2013) e a 110 °C durante 22 horas conforme ITAL (2022). Assim sendo, as amostras de farinha de trigo foram submetidas nessas duas diferentes condições de hidrólise ácida. Após a hidrólise, os aminoácidos livres obtidos foram derivatizados conforme o item 4.3.2 e injetados nas condições cromatográficas citadas no item 4.3.3. Os cromatogramas estão apresentados pelas **Figuras 7 e 8**.

**Figura 7.** Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 110 °C durante 22 horas.



Legenda: 1: Ácido aspártico; 2: Ácido glutâmico; 3: Serina; 4: Glicina; 5: Histidina; 6: Arginina; 7: Treonina; 8: Alanina; 9: Prolina; 10: Tirosina; 11: Valina; 12: Metionina; 13: Cistina; 14: Isoleucina; 15: Leucina; 16: Fenilalanina; 17: Lisina; 18: Compostos do agente de derivatização

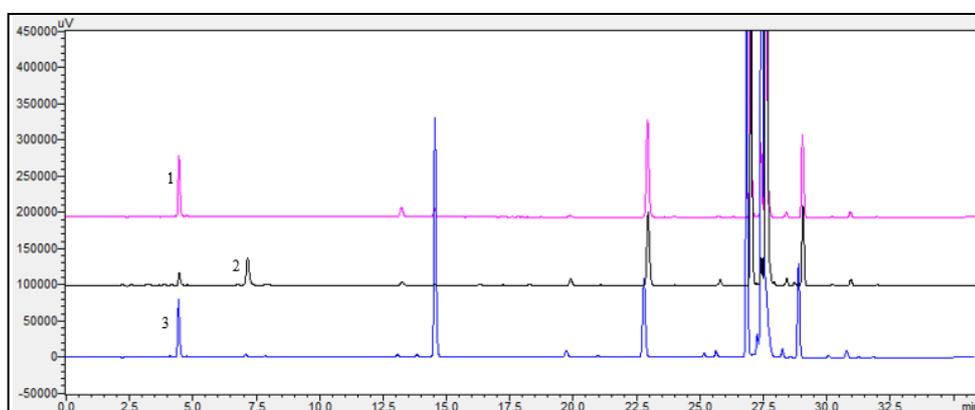
**Figura 8.** Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 150 °C durante 6 horas.



Legenda: 1: Ácido aspártico; 2: Ácido glutâmico; 3: Serina; 4: Glicina; 5: Histidina; 6: Arginina; 7: Treonina; 8: Alanina; 9: Prolina; 10: Tirosina; 11: Valina; 12: Metionina; 13: Cistina; 14: Isoleucina; 15: Leucina; 16: Fenilalanina; 17: Lisina; 18: Compostos do agente de derivatização

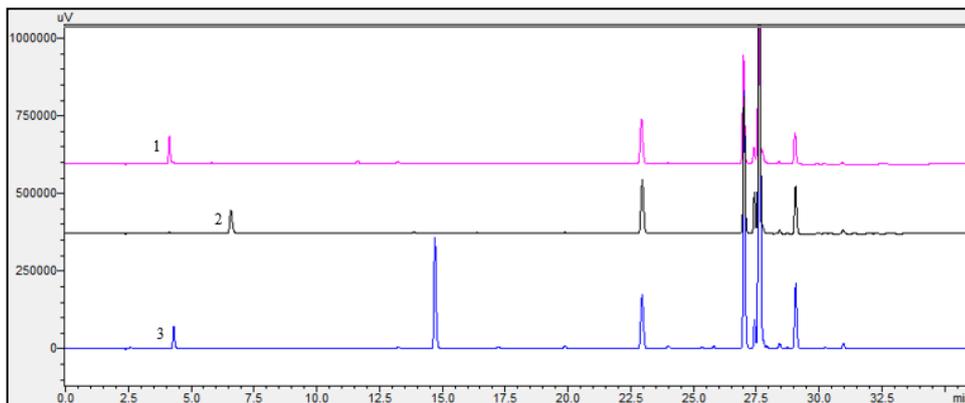
Inicialmente, ao comparar visualmente os cromatogramas obtidos, concluiu-se que após a hidrólise ácida, em ambas as condições testadas, obteve-se 17 aminoácidos livres presentes na farinha de trigo, que são exatamente os mesmos aminoácidos presentes no padrão de aminoácidos H. Isso já era esperado, pois durante o processo da hidrólise ácida, os aminoácidos glutamina, asparagina e cisteína são convertidos em ácido glutâmico, ácido aspártico e cistina, respectivamente (**Figuras 9, 10 e 11**). O aminoácido triptofano é degradado em condições de hidrólise ácida (**Figura 12**). Esses resultados foram descritos por DAI e colaboradores (2014) ao trabalharem com análise de aminoácidos presentes nas proteínas de tecidos animais e alimentos.

**Figura 9.** Cromatogramas sobrepostos do aminoácido ácido glutâmico e da glutamina antes e após o processo de hidrólise ácida.



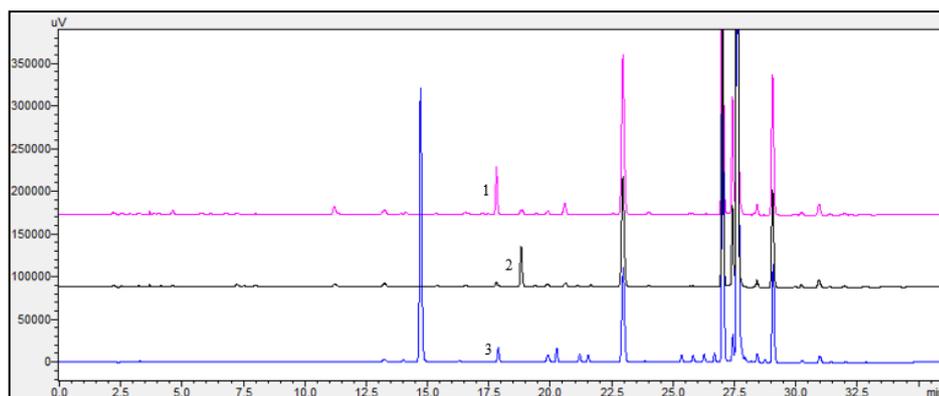
Legenda: 1: ácido glutâmico, 2: glutamina, 3: ácido glutâmico (glutamina após processo de hidrólise ácida)

**Figura 10.** Cromatogramas sobrepostos do aminoácido ácido aspártico e da asparagina antes e após o processo de hidrólise ácida.



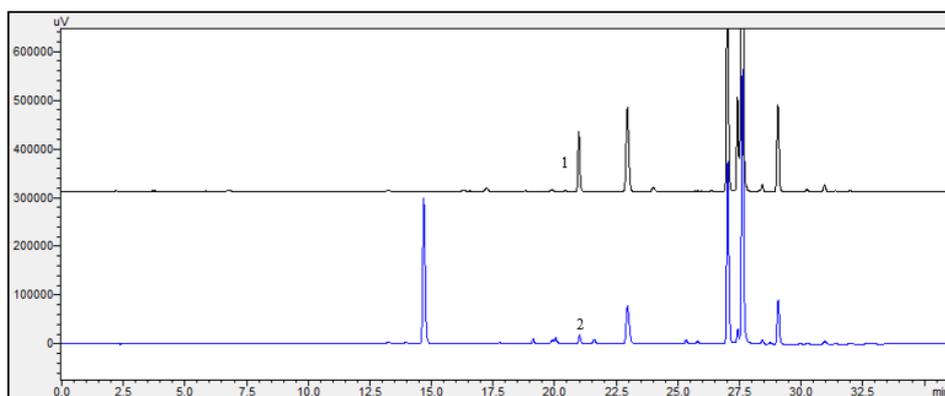
Legenda: 1: ácido aspártico, 2: asparagina, 3: ácido aspártico (asparagina após processo de hidrólise ácida)

**Figura 11.** Cromatogramas sobrepostos do aminoácido cistina e da cisteína antes e após o processo de hidrólise ácida.



Legenda: 1: cistina, 2: cisteína, 3: cistina (cisteína após processo de hidrólise ácida)

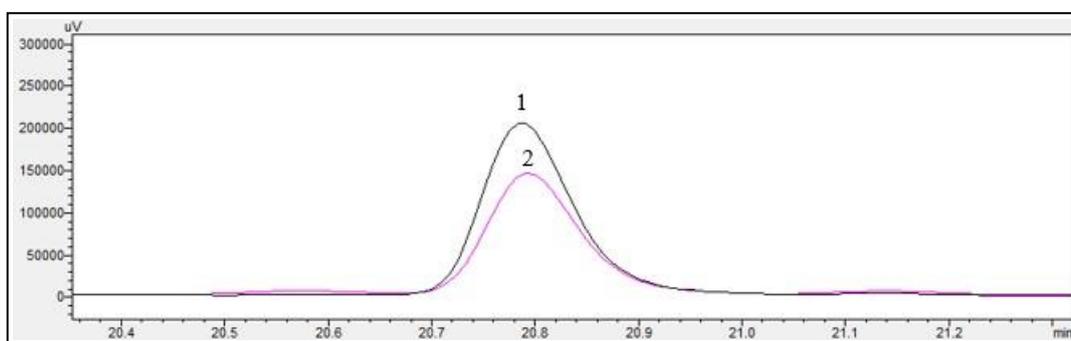
**Figura 12.** Cromatogramas sobrepostos do aminoácido triptofano antes e após o processo de hidrólise ácida.



Legenda: 1: triptofano, 2: triptofano degradado após a hidrólise ácida.

Entretanto, ao fazer a comparação das áreas e alturas obtidas nas duas diferentes condições de hidrólise testadas, concluiu-se que na hidrólise com 22 horas à 110 °C as áreas e alturas obtidas foram maiores para os 17 aminoácidos. Na **Figura 13** está demonstrado o pico de PHE obtido nas duas condições, no qual pode-se observar que o pico obtido na condição de 110 °C durante 22 horas está maior quando aquele obtido na condição de 150 °C durante 6 horas. Dessa forma, optou-se pelo uso do método de hidrólise ácida a 110 °C durante 22 horas, para ser alcançados valores mais próximos do real presentes no alimento.

**Figura 13.** Zoom dos cromatogramas sobrepostos obtidos das diferentes condições de hidrólise ácida, na região do pico da PHE.



Legenda: 1: Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 110 °C durante 22 horas; 2: Cromatograma obtido para análise de hidrólise ácida a 150 °C durante 6 horas.

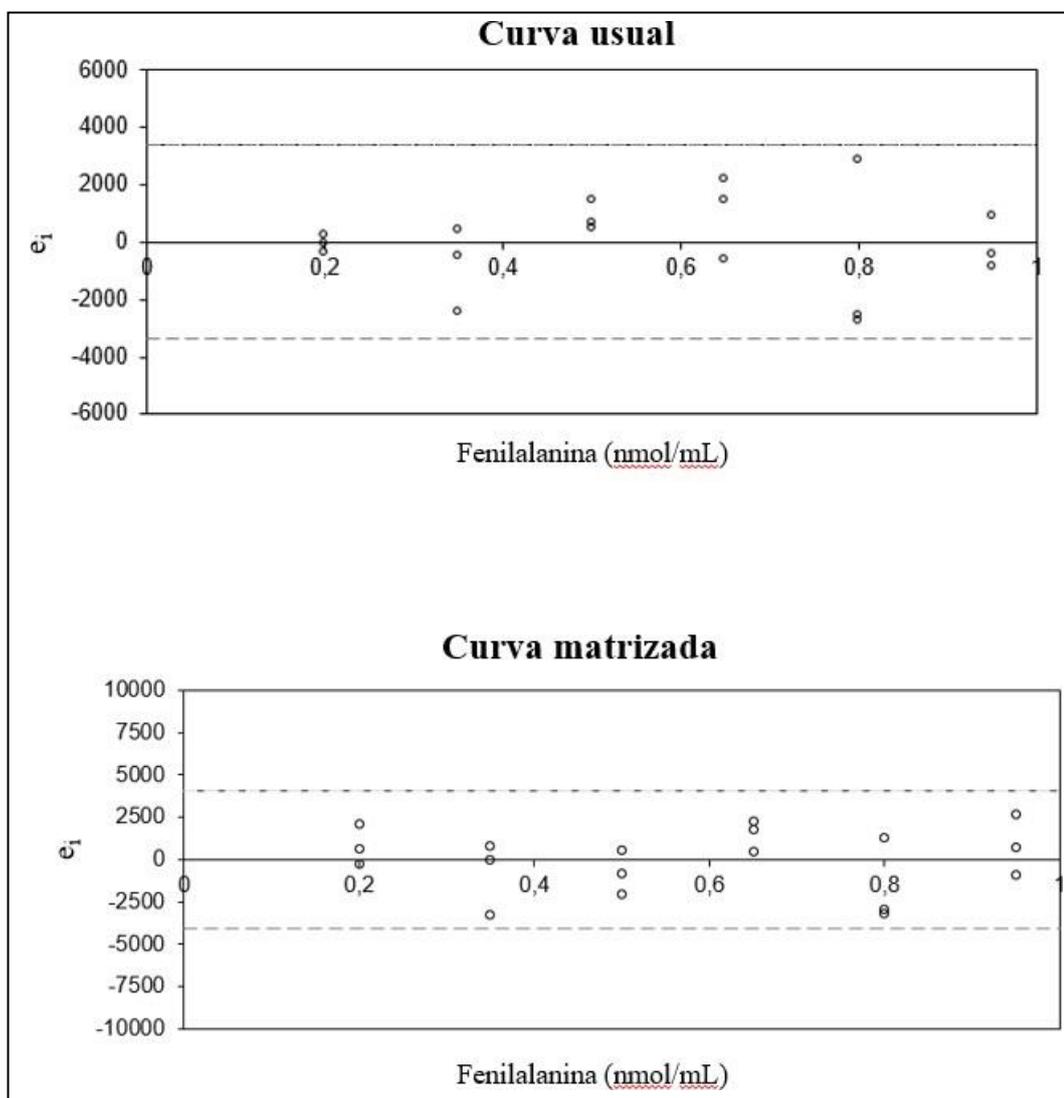
## 5.2 Validação

### 5.2.1 Linearidade e Efeito Matriz

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da linearidade foram apresentados por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples, tanto para a curva em solvente como para a matrizada.

Os gráficos exploratórios dos resíduos da regressão, com indicação dos possíveis *outliers* está apresentado na **Figura 14**. Não foi detectado nenhum *outlier* no intervalo de confiança dos resíduos ( $\pm t_{(0,97; n-2)} S_{res}$ ) para ambas as curvas. Tal fato, foi confirmado pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

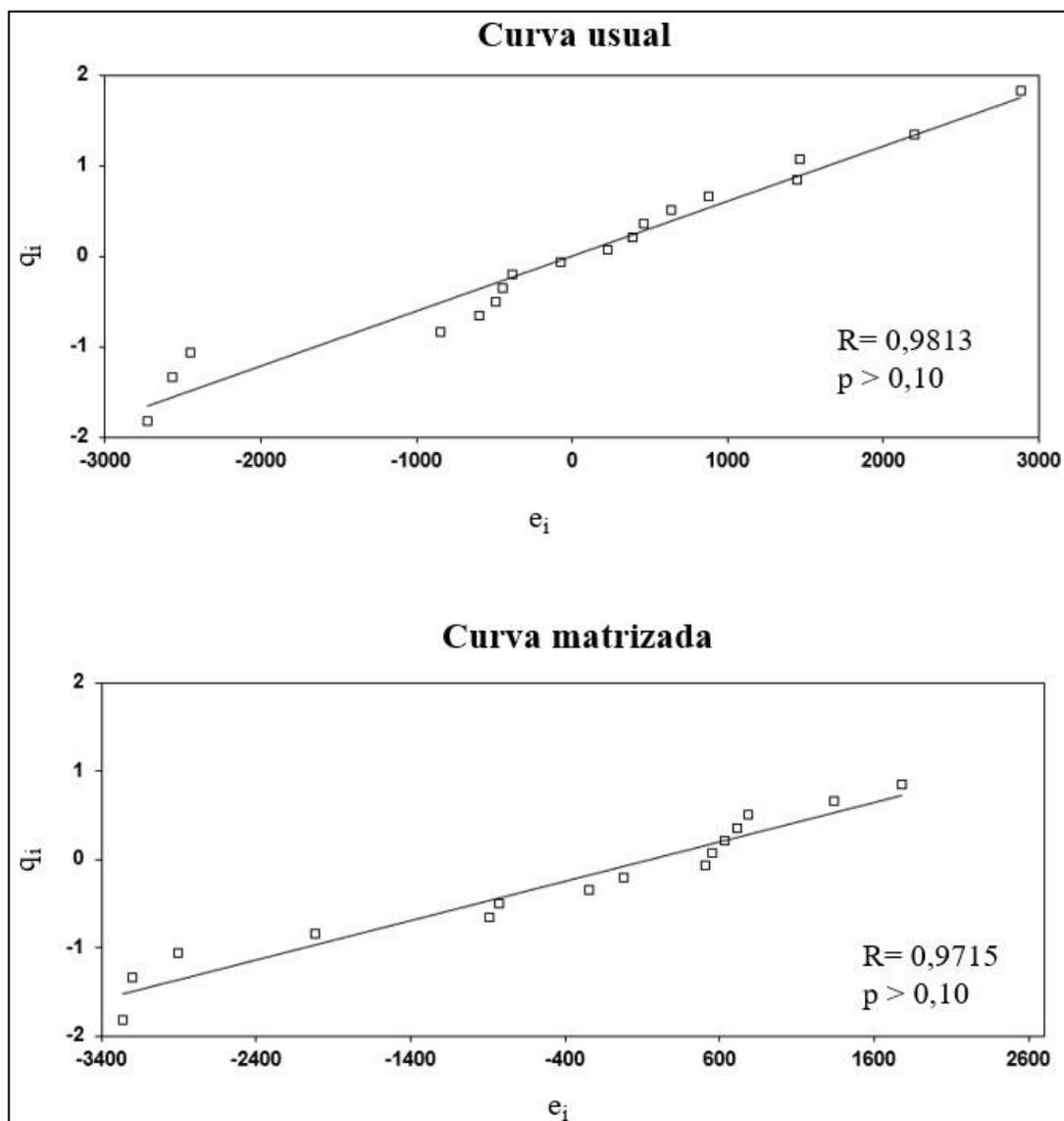
**Figura 14.** Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1M (0,20 a 0,95 nmol/mL), com indicação que nenhum *outlier* foi diagnosticado pelo teste de resíduos padronizados Jackknife



Legenda:  $e_i$ : resíduo da regressão, ----- ( $\pm t_{(0,97; n-2)} S_{res}$ )

O teste de Ryan-Joiner foi empregado para verificar a premissa da distribuição normal dos resíduos da regressão. Os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,9813 e 0,9715, superior ao valor crítico de 0,9567, para a curva em solvente e em matriz de farinha de trigo, respectivamente. Tais resultados mostraram que o desvio da distribuição normal não foi significativo ( $p > 0,10$ ); Os gráficos da probabilidade normal referentes às curvas estão ilustrados na **Figura 15**:

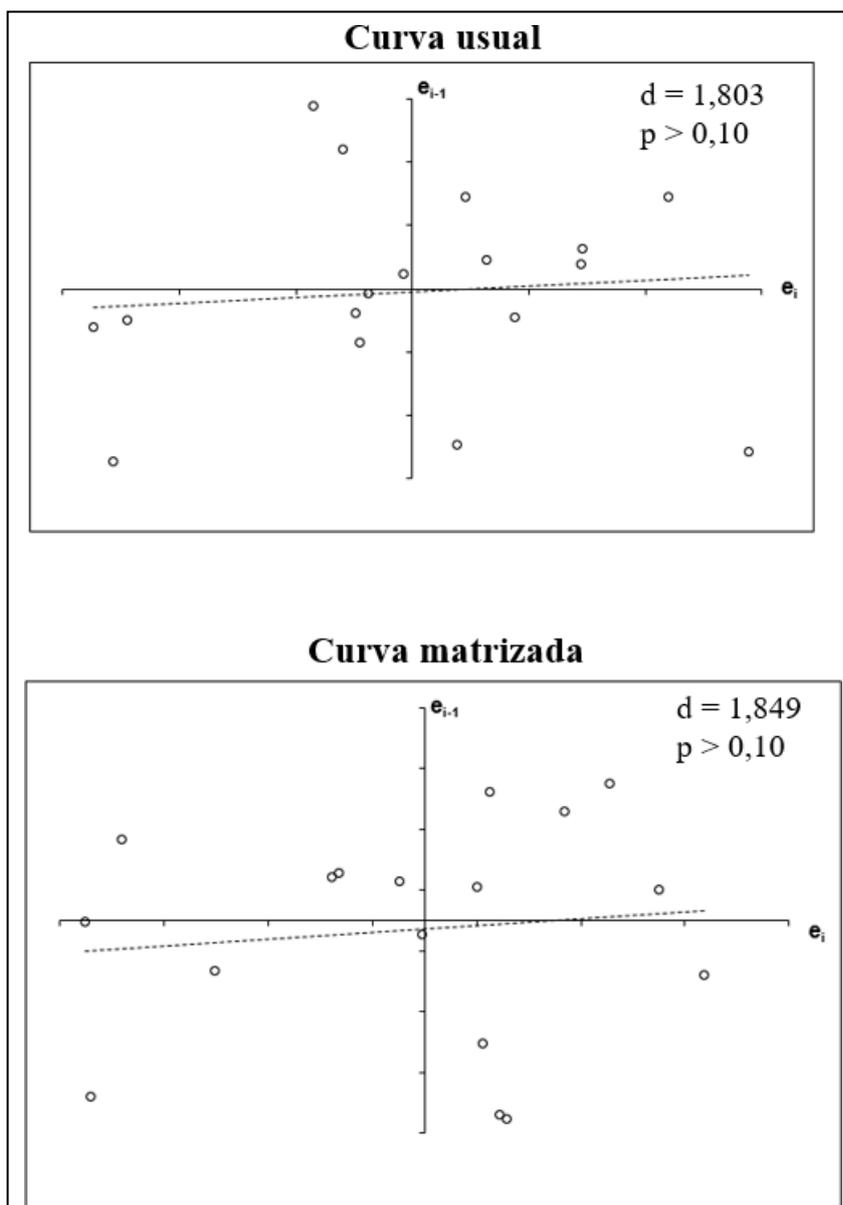
**Figura 15.** Gráficos de probabilidade normal das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL.



Legenda:  $e_i$  = resíduo da regressão,  $q_i$  = valor normal esperado,  $R$  = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner,  $p$  = significância do desvio da distribuição normal.

A independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. Houve independência dos resíduos da regressão, sendo observado um perfil homogêneo de distribuição dos pontos nos quatro quadrantes do gráfico de Durbin-Watson, em ambas as curvas (**Figura 16**). A estatística calculada foi de 1,803 para a curva em solvente e de 1,849 para a curva matrizada de farinha de trigo ( $p > 0,10$ ), sugerindo que não houve autocorrelação.

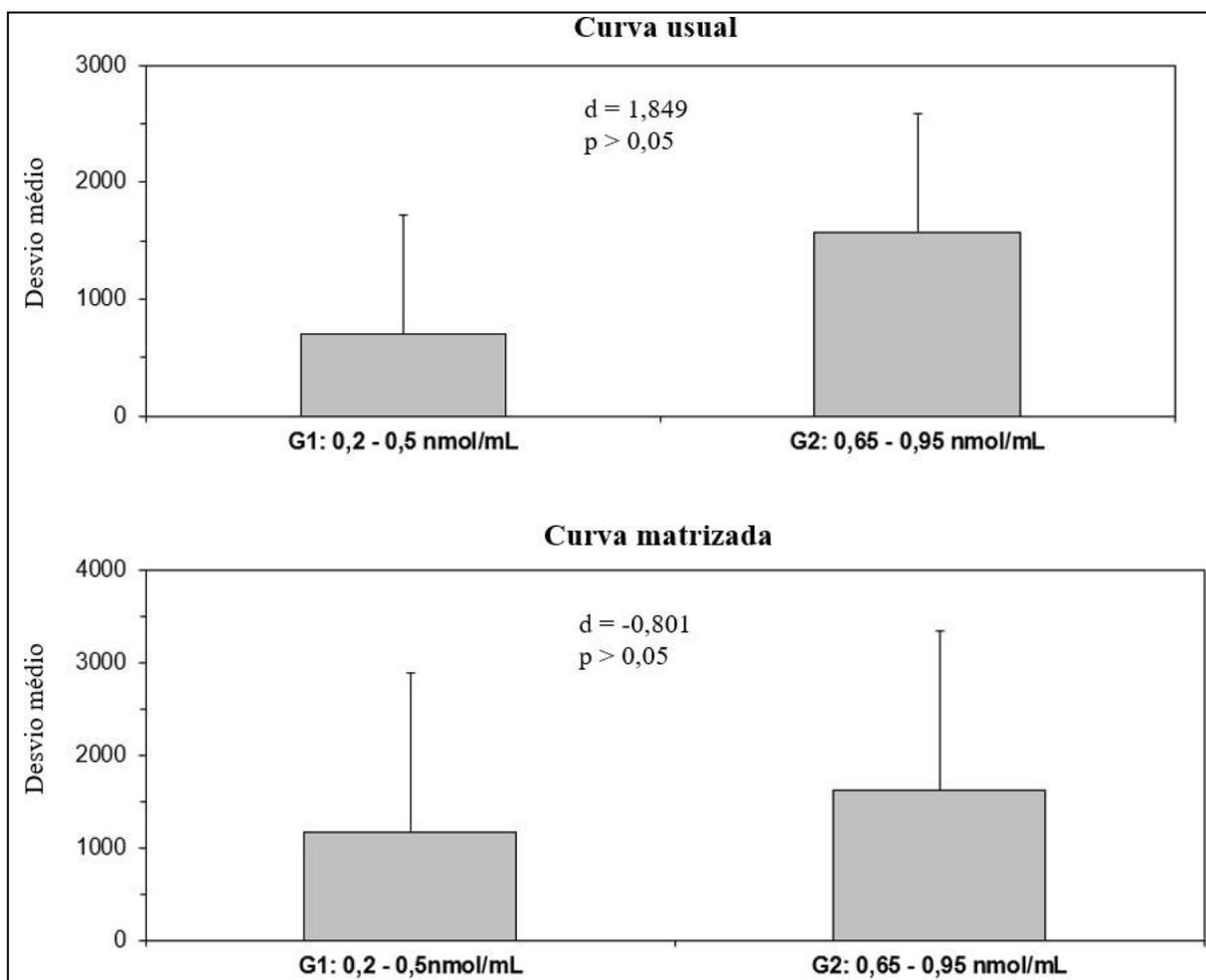
**Figura 16.** Gráficos de Durbin-Watson da curva, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL.



Legenda:  $e_i$  = resíduo da regressão,  $d$  = estatística de Durbin-Watson,  $p$  = significância.

A premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi confirmada. A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma vez que a estatística  $t$  de Levene, não foi significativa ( $p > 0,05$ ), nas curvas em estudo, com valor estimado em 1,849 para a curva em solvente e de -0,801 para a curva em matriz de farinha de trigo, com valores críticos de 0,0831 e 0,4346, respectivamente (**Figura 17**).

**Figura 17.** Representação da homogeneidade das variâncias das curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M (0,20 a 0,95 nmol/mL) pelo teste de Levene modificado.



Legenda:  $t_L$  = estatística t de Levene modificado,  $p$  = significância, G1 = grupo 1; G2 = grupo 2

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal são homoscedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de  $t$  e  $F$ , além do emprego adequado do MMQO sem ponderações. Conforme indicado na **Tabela 9**, a regressão foi significativa ( $p < 0,001$ ), com desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ), indicando linearidade na faixa estudada de 0,20 a 0,95 nmol/mL, em ambas as curvas.

**Tabela 9.** Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para as curvas, em solvente e matrizada, de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M (0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL).

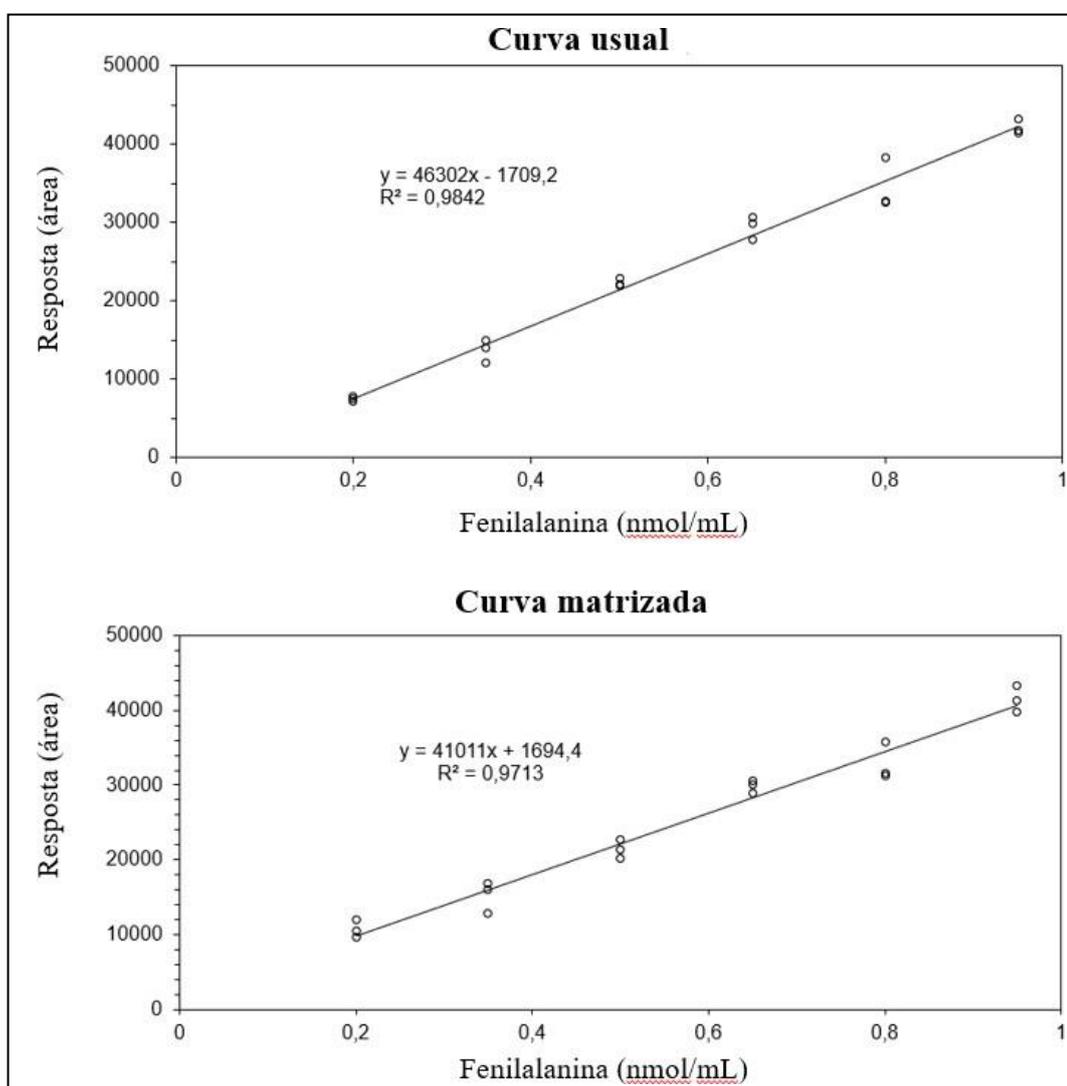
Estatística	Curva usual	Curva matrizada
Regressão		
F	995,42	542,08
F <sub>crítico</sub>	7,76x10 <sup>-16</sup>	9,08x10 <sup>-14</sup>
<i>p</i>	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001
Desvio da linearidade		
F	0,913	1,856
F <sub>crítico</sub>	4,88x10 <sup>-1</sup>	1,83x10 <sup>-1</sup>
<i>p</i>	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: F = razão entre variâncias, F<sub>crítico</sub> = valor crítico tabelado, *p* = significância

As curvas de calibração com respectiva equação e coeficiente de determinação estão ilustradas na **Figura 18**.

**Figura 18.** Curvas de calibração obtidas em solvente e em matriz de PHE em solução de ácido clorídrico 0,1 M, na faixa de 0,20 nmol/mL a 0,95 nmol/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação.



Legenda:  $y$  = resposta (área),  $x$  = concentração PHE em nmol/mL,  $R^2$  = coeficiente de determinação

Na literatura, encontram-se estudos que avaliam a linearidade em função apenas dos valores estimados para os de determinação ( $R^2$ ). TSOCHATZIS e colaboradores (2019) encontraram faixa linear entre 0,5 a 200  $\mu\text{g/mL}$  para quantificação de PHE em farinha de trigo pelo método de cromatografia de interações hidrofílicas de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa (HILIC-UHPLC/MSMS), adotando  $R^2$  como estimativa da linearidade, sendo encontrado um valor de 0,996. Baseado em um valor de  $R^2$  de 0,9957, MUSTATEA e colaboradores (2018) demonstraram que a técnica de cromatografia de íons com

detecção eletroquímica pulsada foi capaz de obter uma faixa linear para a quantificação de PHE em produtos à base de cereais que variou de 1 a 5  $\mu\text{mol/L}$ .

Entretanto, é equivocado assumir a adequação de um modelo linear tendo como base apenas a referida estimativa. Se os pontos de uma calibração estiverem bem ajustados a uma curva qualquer, o valor experimental de  $R^2$  será próximo de um. Contudo,  $R^2$  próximo a um não necessariamente significa que o modelo matemático que melhor explica a dispersão dos dados seja uma regressão linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Para a avaliação do efeito de matriz na faixa linear (0,20 a 0,95  $\text{nmol/mL}$ ), o teste de  $t$  foi adotado para comparar os parâmetros interseção e inclinação. O teste de  $F$  indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e em matriz, com valor  $F$  de 1,440651, sendo o valor de  $F$  crítico de 2,333484 ( $p = 0,001$ ). Portanto, foi utilizado teste de  $t$  com variâncias combinadas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, houve diferença significativa quando as inclinações da curva em solvente e em matriz foram comparadas entre si ( $p > 0,05$ ), indicando efeito matriz (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Comparações entre as interseções e inclinações obtidas para a curva em matriz de farinha de trigo com a estimada para a curva em solvente, na faixa de 0,20 a 0,95  $\text{nmol/mL}$ .

Estatística	Curva em matriz versus em solvente
$t_c$	2,036933
$t_a$	2,3583619
$p$	0,024630
$t_b$	2,307528
$p$	0,0276454

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda:  $t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_c$  = valor crítico para a estatística  $t$ ,  $p$  = significância.

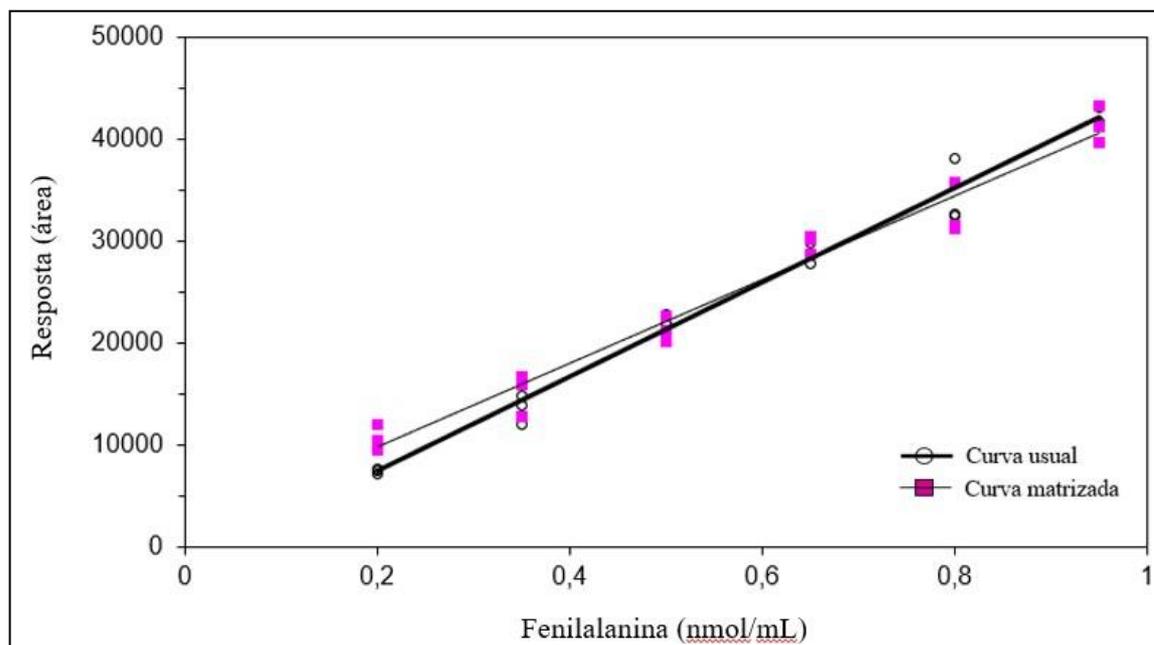
Com base nestes resultados, foi possível inferir que a curva em solvente analisada forneceu respostas que diferiram significativamente daquela obtida para a curva feita com a matriz de farinha de trigo, nos mesmos níveis de concentração.

Essa diferença significativa entre os interceptos e inclinações das curvas já era esperada, pois não havia disponibilidade de amostras de farinha de trigo isentas de PHE, ou seja, cada ponto da curva de calibração em matriz já tinha um valor prévio de PHE, oriundo do extrato da

farinha de trigo hidrolisada. Resultados semelhantes também foram encontrados por CARREIRA e colaboradores (2009), que validaram um método quantitativo para determinação de PHE em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda.

Na **Figura 19** estão representadas as curvas obtidas durante a avaliação do efeito matriz.

**Figura 19.** Curvas de calibração de PHE no solvente e na matriz de farinha de trigo obtidas no ensaio de avaliação do efeito de matriz, na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL.



Legenda: Parâmetros da regressão:  $y = 46302x - 1709,2$  para a curva em solvente,  $y = 41011x + 1694,4$  para a curva em matriz de farinha de trigo, sendo  $y =$  resposta em área do pico,  $x =$  concentração de PHE em nmol/mL.

### 5.2.2 Seletividade

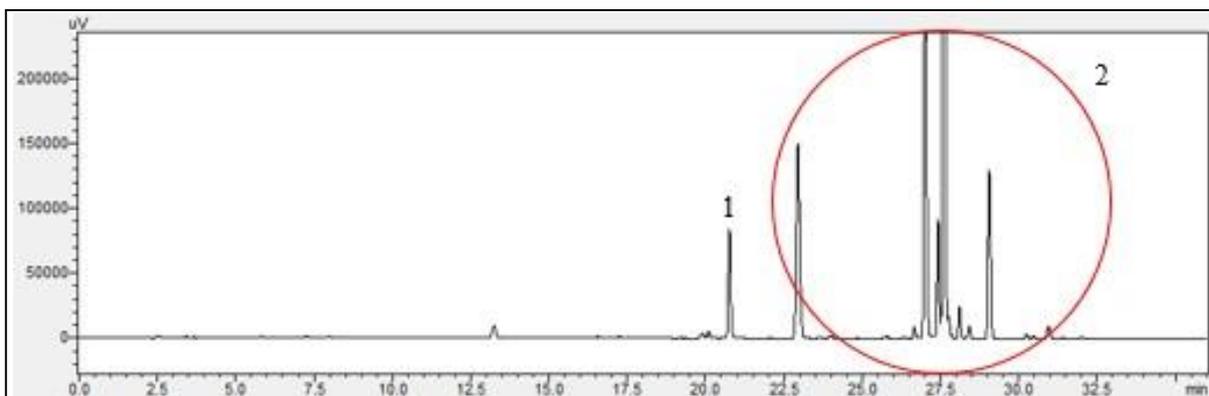
A seletividade do método foi avaliada qualitativamente pela inspeção visual do perfil cromatográfico, comparando-se os tempos de retenção de 22 diferentes aminoácidos (**Tabela 11**) e também analisando os possíveis interferentes presentes no branco de solvente derivatizado. A PHE eluiu com tempo de retenção de 20,759 minutos (**Figura 20**). Nesse tempo de retenção não eluiu nenhum outro aminoácido, assim como, não houve a presença de picos do branco de solvente derivatizado, demonstrando ser um método seletivo para a PHE (**Figura 21 e 22**).

**Tabela 11.** Tempo de retenção dos 22 aminoácidos analisados para a seletividade.

Aminoácido	Tempo de Retenção
Ácido aspártico	4,127
Ácido glutâmico	4,447
Hidroxi prolina	5,710
Asparagina	6,582
Glutamina	7,158
Serina	7,230
Glicina	7,969
Histidina	8,235
Arginina	9,596
Treonina	10,738
Alanina	11,268
Prolina	12,121
Tirosina	15,637
Valina	17,187
Metionina	17,619
Cistina	17,804
Cisteína	18,812
Isoleucina	19,619
Leucina	19,908
Fenilalanina	20,759
Triptofano	20,979
Lisina	22,037

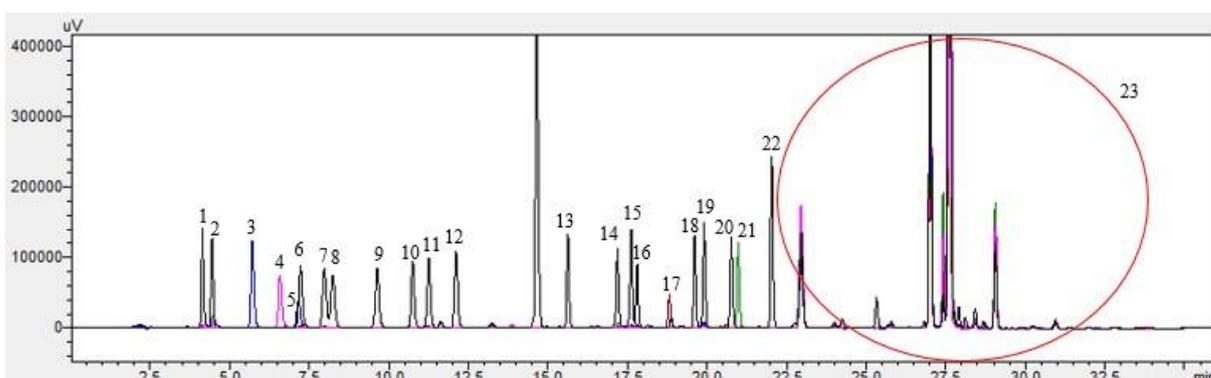
Fonte: Elaborado pela autora

**Figura 20.** Cromatograma obtido para o aminoácido PHE derivatizado.



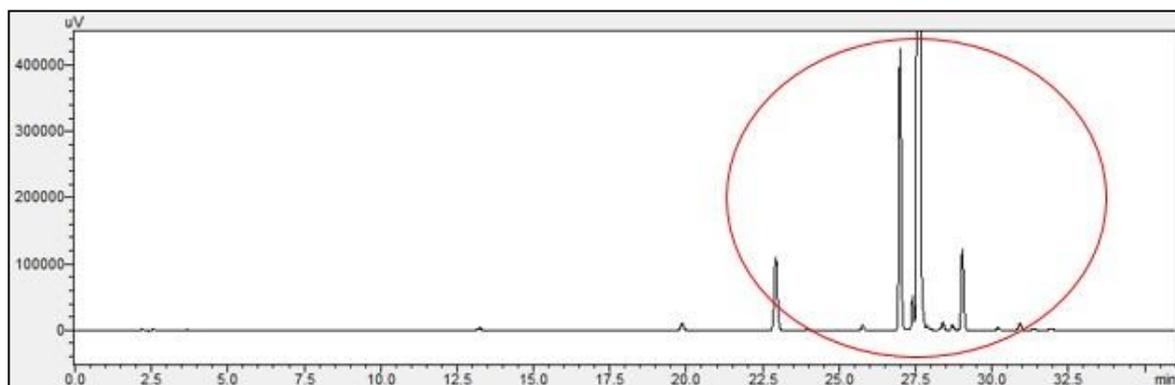
Legenda: 1: fenilalanina; 2: compostos do agente de derivatização

**Figura 21.** Cromatograma obtido para os 22 aminoácidos analisados.



Legenda: 1: Ácido aspártico; 2: Ácido glutâmico; 3: Hidroxiprolina; 4: Asparagina; 5: Glutamina; 6: Serina; 7: Glicina; 8: Histidina; 9: Arginina; 10: Treonina; 11: Alanina; 12: Prolina; 13: Tirosina; 14: Valina; 15: Metionina; 16: Cistina; 17: Cisteína; 18: Isoleucina; 19: Leucina; 20: Fenilalanina; 21: Triptofano; 22: Lisina; 23: compostos do agente de derivatização

**Figura 22.** Cromatograma obtido para o branco derivatizado. Os picos em destaque são compostos do agente de derivatização.

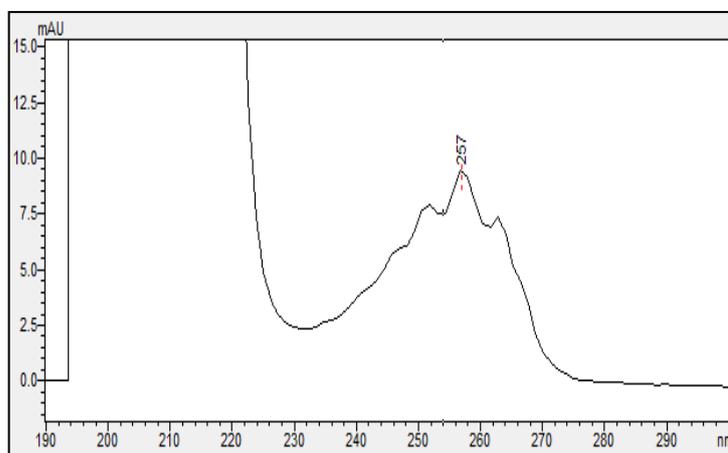


A glutamina eluiu com um tempo de retenção (7,158) semelhante ao da serina (7,230). Essa co-eluição não é um problema, pois ao passar pela etapa de hidrólise ácida, a glutamina se converte em ácido glutâmico, que possui tempo de retenção de 4,447 minutos.

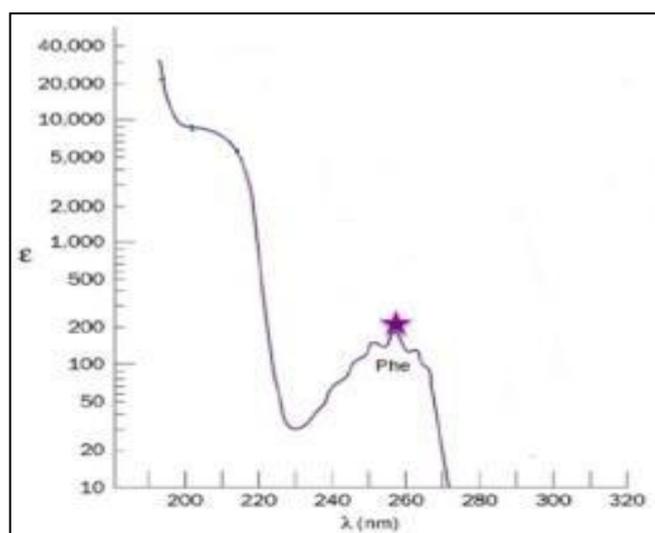
Há um pico do branco de solvente derivatizado que elui no mesmo tempo de retenção que o aminoácido leucina.

Foi feita a comparação do espectro de ultravioleta obtido quando foi injetada a PHE sem derivatização (**Figura 19**) e comparou-se com o espectro encontrado na literatura (**Figura 20**)

**Figura 23.** Espectro no ultravioleta obtido para PHE.



**Figura 24.** Espectro no ultravioleta da PHE obtido na literatura.



Fonte: Adaptado de JAKUBOWSKI, 2019

Pode-se observar a semelhança entre os espectros, que tem como característica principal esses 3 picos, sendo o de comprimento de onda máximo em 257nm. Tais resultados corroboram que o pico corresponde ao aminoácido PHE.

### 5.2.3 Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermediária

Os valores individuais de recuperação dos 3 níveis estão demonstrados na **Tabela 12**:

**Tabela 12.** Recuperações obtidas pelos analistas 1 e 2 para os três níveis de concentração estudado.

	% Recuperação		
	62,46 mg/100g	124,92 mg/100g	224,85 mg/100g
Analista 1	98,17	99,83	93,09
	105,21	87,77	79,98
	97,55	102,78	87,81
	99,11	102,21	95,01
	91,39	80,07	89,40
	107,41	99,79	87,89
	97,26	98,86	89,93
	75,83	96,67	88,76
Analista 2	92,89	91,89	88,06
	100,80	89,84	87,50
	97,25	92,39	88,41
	100,25	94,86	85,42
	92,43	93,10	80,42
	95,57	87,04	90,16
	92,48	91,45	84,11
	95,62	88,56	83,85

Fonte: Elaborado pela autora

O teste de Grubbs indicou presença de somente um outlier ( $p > 0,05$ ) dentre as dezesseis repetições do menor nível de concentração estudado, com valor de recuperação de 75,83%. Para os outros níveis, o teste de Grubbs não indicou a presença de outlier ( $p > 0,05$ ). Os valores de  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  para cada nível estudado estão demonstrados na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Valores de  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  para cada nível estudado na recuperação e precisão.

	Concentração (mg/100g)					
	62,46		124,92		224,85	
n	15		16		16	
G	Calculado	Crítico	Calculado	Crítico	Calculado	Crítico
$G_{1L}$	1,342	2,409	2,165	2,439	1,865	2,439
$G_{1U}$	2,143	2,409	1,478	2,439	1,869	2,439
$G_2$	3,484	4,170	3,643	4,234	3,734	4,234
$G_{3L}$	0,251	0,618	0,435	0,599	0,500	0,599
$G_{3U}$	0,605	0,618	0,313	0,599	0,413	0,599

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: n: número de observações

As médias de recuperação para os níveis baixo, médio e alto foram de 97,56%, 93,57% e 87,49%, com os desvios padrões de 4,69%, 6,24% e 4,03%, respectivamente. Tais resultados atendem aos critérios estabelecidos de 80% a 110%. Isso indica que as recuperações são adequadas e que o método não é inexato nos níveis estudados.

Normalidade e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação foram observadas pelos testes de Ryan-Joiner ( $p > 0,10$ ) e Levene modificado ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 14**), respectivamente, permitindo a estimativa dos desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) e precisão intermediária ( $DPR_R$ ) por análise de variância.

**Tabela 14.** Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos obtidos nos estudos de recuperação em diferentes níveis de concentração.

Estatística	Concentração (mg/100g)		
	62,46	124,92	224,85
Normalidade dos resíduos			
R	0,9438	0,9638	0,9456
R <sub>crítico</sub>	0,9506	0,9529	0,9529
Homoscedasticidade dos resíduos			
F <sub>L</sub>	0,263	1,738	0,158
F <sub>crítico</sub>	4,667	4,600	4,600
<i>p</i>	0,798	0,801	0,418

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, F<sub>L</sub> = estatística F de Levene.

Os valores de DPR<sub>r</sub> e DPR<sub>R</sub>, estimados por análise de variância, para cada nível de concentração estudado, estão demonstrados na **Tabela 15**. Tais resultados sinalizam a precisão do método.

**Tabela 15.** Desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e precisão intermediária, obtidos em diferentes níveis de concentração.

Concentração (mg/100g)	Valores calculados (%)		Critérios de aceitabilidade (%)	
	DPR <sub>r</sub>	DPR <sub>R</sub>	DPR <sub>r</sub>	DPR <sub>R</sub>
62,46	4,49	4,90	<14,67	<22,00
124,92	6,32	6,95	<14,67	<22,00
224,85	4,31	5,11	<14,21	<21,31

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: DPR<sub>r</sub>= desvio padrão relativo de repetitividade, DPR<sub>R</sub>= desvio padrão relativo de precisão intermediária.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com aqueles reportados na literatura. LIYANAARACHCHI e colaboradores (2018) obtiveram DPR<sub>r</sub> e DPR<sub>R</sub> abaixo de 10% e as recuperações dentro de 80 a 110%, ao analisarem aminoácidos presentes no arroz pela técnica de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas. Esses mesmos resultados

foram obtidos por CUI e colaboradores (2014) ao empregarem a técnica de CLAE com detector UV.

#### **5.2.4 Limite de Detecção e Quantificação**

O LOD teórico foi estimado em 3,20 mg/100g (correspondente a 0,013 nmol/mL), enquanto que o LOQ teórico foi de 12,80 mg/100g (correspondente a 0,051 nmol/mL). Estes limites foram, provavelmente, subestimados, uma vez que os experimentos foram conduzidos com branco de reagentes. De qualquer forma, a faixa de validação do método encontra-se acima destes valores, que foi de 49,97 a 237,34 mg/100g (correspondente a 0,20 a 0,95 nmol/mL) de PHE em farinha de trigo.

TASAKIS E TOURAKI (2018) também utilizaram CLAE com detector de UV, porém estimaram os valores de limite de detecção e quantificação a partir da curva analítica, e encontraram valores superiores aos obtidos nesse estudo. Os valores de LOD e LOQ foram de 0,49 e 1,50 nmol/mL para o aminoácido PHE, respectivamente.

TSOCHATZIS, PAPAGEORGIU E KALOGIANNIS (2019), que também validaram um método para quantificar aminoácidos em farinha de trigo, porém empregando HILIC-UHPLC/MSMS, encontraram valores de LOD e LOQ de 7 mg/100g e 20 mg/100g, respectivamente.

## 6 CONCLUSÃO

Um método de CLAE com detector UV foi otimizado e validado para a quantificação de PHE em farinha de trigo após hidrólise ácida e derivatização com PITC.

Para garantir que a proteína presente na farinha de trigo fosse completamente hidrolisada para obtenção da PHE na sua forma livre, foi determinada que a melhor condição experimental foi de 110 °C durante 22 horas. Isso contribuiu significativamente para a recuperação do analito na matriz.

A otimização das fases móveis foi essencial para obter repetibilidade dos resultados, enquanto a otimização do gradiente de concentração contribuiu para uma boa resolução dos picos dos aminoácidos.

A validação do método otimizado para análise de PHE em farinha de trigo demonstrou adequação ao propósito de uso. A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples na faixa de 0,20 a 0,95 nmol/mL para as curvas em solvente e em matriz. Efeito de matriz significativo foi observado quando comparado com a curva usual. Recuperações e DPR dentro dos critérios de aceitabilidade foram obtidos para farinha de trigo na faixa de 62,46 a 224,85 mg/100g. Os limites de detecção e quantificação determinados para o método foram adequados, uma vez que se encontram abaixo do primeiro ponto da faixa de validação do método.

A farinha de trigo pertence ao grupo 5 do triângulo de composição da AOAC. Com a validação de mais um alimento pertencente a esse mesmo grupo, uma gama de alimentos poderá ser avaliada através dessa metodologia validada. Dispor de informações sobre os teores de PHE presente nesses alimentos contribui para manter concentrações séricas desse aminoácido de acordo com as recomendações individuais dos pacientes fenilcetonúricos. Além disso auxilia profissionais de saúde a prescrever dietas com valores mais exatos e precisos de PHE. Dessa forma, há possibilidades de elaboração de novas dietas, o que incentiva a promover a integração social desses indivíduos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGEITEC. **Agência EMBRAPA de informação tecnologia**. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html). Acesso em: 30 de abril de 2022

ANVISA, **Informe Técnico N° 49, de 11 de abril de 2012 - Esclarecimentos sobre a Fenilcetonúria**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fenilalanina-em-alimentos>>. Acesso em: 24 de Abril 2022.

AOAC. **Methods of analysis for nutrition labeling**. Arlington, VA, pp 111–122. 1993

BAI, J. et al. Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines in Tuna and Mahi-Mahi by Reversed-Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 28, n. 8, p. 848–860, 14 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **RESOLUÇÃO - RDC N° 617, DE 9 DE MARÇO DE 2022. Dispõe sobre a obrigatoriedade da realização de análises laboratoriais e da transmissão de informações sobre os teores de fenilalanina, proteínas e umidade em alimentos industrializados**. Diário Oficial da União. Publicado em: 16/03/2022, Edição: 51, Seção: 1, Página: 111. Brasília, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria conjunta nº 12, de 10 de setembro de 2019. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Fenilcetonúria**. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários /**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 72 p. ISBN 978-85-7991-053-1, 2011.

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

BLAU, N.; SPRONSEN, F. V; LEVY, H. L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v.376, n.9750, p.1417–1427, 2010.

BORRAJO, G. J. C. Triagem neonatal na América Latina no início do século XXI. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v.30, p.466-481, 2007.

BROWN M. B, FORSYTHE A. B. Robust tests for the equality of variance. **Journal of the American Statistical Association**. v.69: p.364-367, 1974

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

CARREIRA, R. L.; RAMOS, C. S.; MUNDIM, L. A.; LIMA, L. G.; SOUZA, S. V. C.; SILVESTRE, M. P. C. Validação intralaboratorial de metodologia quantitativa para determinação de L-fenilalanina em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.68(2), p.278-88, 2009.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CUI, Y. et al. Enantiomeric purity determination of (L)-amino acids with pre-column derivatization and chiral stationary phase: Development and validation of the method. **Food Chemistry**, v. 158, p. 401–407, 1 set. 2014.

CUNHA, G. O. S.; BARONI, M. O.; CUNHA, M. G. M. **Análise bromatológica de três hipercalóricos: existe a necessidade de utilizá-los?** - Trabalho de conclusão de Curso para obtenção do Título de Graduação em Nutrição, do Centro Universitário de Belo Horizonte (UNI-BH), 2011.

DAI, Z.; WU, Z.; JIA, S.; WU, G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, 964 (2014) 116–127, 2014.

EL HUSNY, A. S; FERNADES-CALDATO, M.C. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. **Revista Paraense de Medicina**. v.20, n.2, Belém jun. 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Trigo: alimento funcional e nutritivo. 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18048471/trigo-alimento-funcional-e-nutritivo>. Acesso em: 30 de abril de 2022.

EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods** – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

FERREIRA, C.R; VAN KARNEBEECK, C.D.M. Inborn errors of metabolismo. **Handbook of Clinical Neurology**. vol. 162 (3rd series), p. 449-481, 2019.

GROOT, M. J., HOEKSMAN, M., BLAU, N., REIJNGOUD, D. J., VAN SPRONSEN, F. J Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. **Molecular Genetics and Metabolism**. v.99 (Suppl 1), p.86–89, 2010

GRUBBS F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**. 1969; 11: 1-21.

HÖRSTER F. SCHWAB, M. A.; SAUER, S. W.; PIETZ, J.; HOFFMANN, G. F.; OKUN, J. G.; KOLLER, S.; KINS, S. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. **Pediatrics**. Res 59, 544–548, 2006.

HORWITZ W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**. 1995; 67: 331-43.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 Revisão 09. Jun. 2020.

ISO (International Standards Organization). ISO 5725-1. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Parts 1, 2, 3, 4 and 6**. Geneva: ISO; 1994.

ISO (International Standards Organization). ISO 5725-5. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5**. Geneva: ISO; 1998.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Procedimento Operacional Padrão. **Aminoácidos totais por derivatização pré coluna**. Campinas, SP, 2022.

JAJIC, I. et al. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 6, p. 839–850, 2013.

JAKUBOWSKI, H. Amino Acid Analysis and Chemical Sequencing. **Biochemistry online**. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological\\_Chemistry/Book%3A\\_Biochemistry\\_Online\\_%28Jakubowski%29/04%3A\\_Protein\\_Structure/4.2%3A\\_Composition\\_Sequence\\_and\\_Conformational\\_Analysis\\_of\\_Proteins/B1.\\_Amino\\_Acid\\_Analysis\\_and\\_Chemical\\_Sequencing](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Book%3A_Biochemistry_Online_%28Jakubowski%29/04%3A_Protein_Structure/4.2%3A_Composition_Sequence_and_Conformational_Analysis_of_Proteins/B1._Amino_Acid_Analysis_and_Chemical_Sequencing)

KUTTATHARMMAKUL S, MASSART D. L, SMEYERS-VERBEKE J. Comparison of alternative measurement methods. **Analytica Chimica Acta**. v.391: p. 03-25, 1999.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Rima editora. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

LEVENE H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB. (Ed.) **Contributions to probability and statistics**. Stanford: Stanford University Press; 1960. p. 278-92.

LIYANAARACHCHI, G. V. V. et al. Development and validation of a method for direct, underivatized analysis of free amino acids in rice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1568, p. 131–139, 21 set. 2018b.

MACDONALD, A., GOKMEN-OZEL, H., VAN RIJIN, M., BURGARD, P. The reality of dietary compliance in the management of phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v.33, p.665–670, 2010.

MACDONALD, A.; VAN WEGBERG, A.M.J.; AHRING, K.; BELO, S.; BÉLANGER-QUINTANA, A.; BURLINA, A.; CAMPISTOL, J.; COSKUN, T.; FEILLET, F.; GIZEWSKA, M.; HUIJBREGTS, S. C.; LEUZZI, V.; MAILLOT, F.; MUNTAU, A. C.; ROCHA, J. C.; ROMANI, C.; TREFZ, F.; VAN SPRONSEN, F. J. PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 171, p. 1-21, 2020.

MAROTO A, RIU J, BOQUÉ R, RIUS F. X. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. **Analytica Chimica Acta**. 1999; 391: 173-85.

MARTINS, A. M. et al. **Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo**. São Paulo: Segmento Farma editores, 2006.

MENEZES, I. R. S. **Aspectos de qualidade da farinha de trigo: uma revisão**. 2020

NUPAD. Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico. Disponível em: <https://www.nupad.medicina.ufmg.br/topicos-em-saude/fenilcetonuria/>. Acesso em: 3 de maio de 2022

PALOMINO-VASCO, M. et al. Automated chromatographic method with fluorescent detection to determine biogenic amines and amino acids. Application to craft beer brewing process. **Journal of Chromatography A**, v. 1601, p. 155–163, 13 set. 2019.

PASSOS, H. M.; CIESLAROVA, Z.; SIMIONATO, A. V. C. CE-UV for the characterization of passion fruit juices provenance by amino acids profile with the aid of chemometric tools. **Electrophoresis**, v. 37, n. 13, p. 1923–1929, 2016.

RYAN T. A, JOINER B. L. **Normal probability plots and tests for normality**. The State College: Pennsylvania State University; 1976.

SCHEUER, P. M., FRANCISCO A., MIRANDA, M. Z., LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011.

SCHLEGEL, G., SCHOLZ, R., ULLRICH, K., SANTER, R., RUNE G.M. Phenylketonuria: direct and indirect effects of phenylalanine. **Experimental Neurology**. v.281, p.28–36, 2016.

SHARPLESS, K. E., GREENBERG, R. R., SCHANTZ, M. M., WELCH, M. J., WIZE, S. A., IHNAT, M. Filling the AOAC triangle with food-matrix standard reference materials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.378 p.1161–1167, 2004.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552; p. 25-35, 2005.

SOARES, R.D.L. **Convivendo com a fenilcetonúria: a percepção materna e da equipe multiprofissional**. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014. (Tese Doutorado em Ciência da Saúde).

SPANO, N. et al. Reversed-phase liquid chromatographic profile of free amino acids in strawberry-tree (*arbutus unedo L.*) honey. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 4, p. 1145–1152, 2009.

SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.33 p.9-12, p.1130-1150, 2010.

TASAKIS, R. N.; TOURAKI, M. Identification of bacteriocins secreted by the probiotic *Lactococcus lactis* following microwave-assisted acid hydrolysis (MAAH), amino acid content analysis, and bioinformatics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 4, p. 1299–1310, 1 fev. 2018.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835855, 2002.

TSOCHATZIS, E.; PAPAGEORGIOU, M.; KALOGIANNIS, S. Validation of a HILIC UHPLC-MS/MS method for amino acid profiling in Triticum species wheat flours. **Foods**, v. 8, n. 10, 2019.

WINN, S. R., SCHERER, T., THÖNY, B. HARDING, C. O. High dose sapropterin dihydrochloride therapy improves monoamine neurotransmitter turnover in murine phenylketonuria (PKU). **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 117, p. 5–11, 2016.

WISE, S. A., PHILLIPS, M. M. Evolution of reference materials for the determination of organic nutrients in food and dietary supplements—a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 411(1), p. 97–127, 2019.

ZHANG, X. K. et al. Changes in monosaccharides, organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous analysis using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 104–112, 1 jan. 2018.

ZHENG, G., JIN, W., FAN, P., FENG, X., BAI, Y., TAO, T., YU, L. A novel method for detecting amino acids derivatized with phenylisothiocyanate by high-performance liquidchromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry** v. 392 p. 1–6, 2015.