



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Desenvolvimento de método analítico para a determinação da
composição de aminoácidos em proteína de soja utilizando sistema SIA
com pervaporação”**

**Dissertação apresentada por
Mirian Suellen Camargo Pedroso ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de Química
do Centro de Ciências Exatas da
Universidade Estadual de Maringá
como parte dos requisitos para a**



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, MARÇO/2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de método analítico para a determinação da
composição de aminoácidos em proteína de soja utilizando sistema SIA
com pervaporação**

Dissertação apresentada por **Mirian Suellen Camargo Pedroso** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

MARINGÁ, MARÇO/2014.



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

**Desenvolvimento de método analítico para determinação da
composição de aminoácidos em proteína de soja utilizando sistema SIA
com pervaporação**

Mirian Suellen Camargo Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr Cláudio Celestino de Oliveira

Maringá, março de 2014.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P372d Pedroso, Mirian Suellen Camargo
Desenvolvimento de método analítico para
determinação da composição de aminoácidos em
proteína de soja utilizando sistema SIA com
pervaporação/ Mirian Suellen Camargo Pedroso. --
Maringá, 2016.
70 f. : il. color, figs. , tabs.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Celestino de
Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-
Graduação em Química, 2014.

1. Análise de aminoácido - Sistema SIA com
pervaporação. 2. Proteína de soja. I. Oliveira,
Claudio Celestino de, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDD 22. ED.543.08711
JLM-001649



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Mirian Suellen Camargo Pedrosa**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 30 de maio de 2014.

COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira
Presidente - DQI/UEM



Prof. Dr. Jessé Vergílio Visentainer
Membro - DQI/UEM



Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe
Membro - UEL

*“Nenhum conhecimento humano
pode ir além de sua experiência.”*

John Locke

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por ser meu refúgio nas horas difíceis, dar-me força e perseverança para alcançar meus objetivos.

A minha mãe, Joraci de Camargo Pedroso, pilar da família, companheira, dedicada aos filhos e ao lar.

Ao meu falecido pai, José Carlos Pedroso, cuja presença física me falta, porém me sobra a certeza de que ainda guia meus passos e torce por mim nas batalhas de minha vida.

A Ana Carolina Máximo, compreensiva e auxiliar nos estudos. Os longos meses que passei longe da família tiveram a saudade minimizada com o seu apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Cláudio Celestino de Oliveira, pela ajuda, paciência e compreensão durante todas as etapas de execução do trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

A toda minha família e colegas que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação, que contribuíram para o meu desenvolvimento;

A todos os colegas de laboratório que me ajudaram quando necessário.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aminoácidos comuns.....	3
2.2 Análise da composição de aminoácidos comuns	4
2.3 Derivatização com ninhidrina	5
2.4 Proteínas.....	9
2.5 Análise da composição de aminoácidos em proteínas.....	9
2.5.1 Etapa 1: Hidrólise de proteínas.....	10
2.5.2 Etapa 2: Determinação do conteúdo de aminoácidos em hidrolisados de Proteína 16	
2.6 Proteína de soja	21
2.7 Análise por injeção sequencial (SIA)	25
2.7.1 Princípios e componentes básicos de SIA	27
2.7.2 Aplicação de sistemas SIA com detectores eletroquímicos	28
2.8 Princípios da técnica de pervaporação.....	29
2.8.1 Classificação das membranas	33
2.8.2 Pervaporação em sistemas de análises químicas em fluxo.....	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	39
4.1 Reagentes	39
4.2 Soluções	39
4.3 Equipamentos.....	40
4.3.1 Reação ninhidrina-aminoácido aplicada em SIA com pervaporação	43
4.3.2 Otimização instrumental.....	43
4.3.3 Otimização química.....	44
5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	45
5.1 Especificidade	45
5.2 Linearidade	46
5.3 Precisão	46

5.4	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	46
5.5	Exatidão	47
5.6	Procedimento.....	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1	Otimização instrumental	52
6.1.1	Vazão durante injeção da solução receptora na confluência Y	52
6.1.2	Tempo de acionamento do forno de micro-ondas	53
6.2	Otimização Química	54
6.2.1	Efeito do agente redutor	54
6.2.2	Avaliação do efeito do solvente e concentração de ninhidrina	55
6.3	Validação do método	56
6.3.1	Especificidade.....	56
6.3.2	Linearidade	57
6.3.3	Limite de detecção e Limite de quantificação	59
6.3.4	Precisão Repetibilidade	59
6.3.5	Exatidão.....	60
7.	CONCLUSÕES.....	65
8.	BIBLIOGRAFIA.....	66

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura dos aminoácidos comuns.....	4
Figura 2. Mecanismo da reação de α -aminoácidos com ninhidrina	8
Figura 3. Diagrama de fitas de proglicinina	23
Figura 4. Diagrama esquemático de ligações de hidrogênio em protómeros de proglicinina.....	24
Figura 5. Esquema típico de um sistema SIA.....	27
Figura 6. Ilustração de pervaporação.....	30
Figura 7. Perfil de processo extrativo em pervaporação	31
Figura 8. Classificação das membranas.....	34
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de membranas	35
Figura 11. Sistema de análise por injeção sequencial	41
Figura 12. Esquema da câmara de pervaporação	42
Figura 13. Imagem da câmara de difusão.....	43
Figura 14. Estudo da vazão durante injeção na confluência Y.....	53
Figura 15. Estudo do tempo de acionamento do forno de micro-ondas	53
Figura 16. Efeito do agente redutor no sinal analítico.....	55
Figura 17. Efeito da concentração de ninhidrina no sinal analítico.....	56
Figura 18 - Análise de linearidade para 5 níveis de concentração de AAs na faixa de 0,5 a 3,5 mmol L ⁻¹	58
Figura 19. Análise de LOD, LOQ e Precisão repetibilidade	60
Figura 20. Análise de exatidão pelo método SIA - Pervaporação.....	61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Aminoácidos comuns	3
Tabela 2. Agentes utilizados em hidrólise ácida de proteínas	11
Tabela 3. Composição de aminoácidos em variedades de farelos de soja	21
Tabela 4. Eventos executadas pelo sistema SIA.....	48
Tabela 5. Frações de aminoácidos em proteínas de cultivares brasileiras de soja	62

Lista de Quadros

Quadro 1. Determinação de N(%) na amostra por método de Kjeldahl.....	61
Quadro 2. Determinação de teor (%) de proteína na amostra por método de SIA com pervaporação.....	63

Desenvolvimento de método analítico para determinação da composição de aminoácidos em proteína de soja utilizando sistema SIA com pervaporação

Autora: Mirian Suellen Camargo Pedroso

Orientador: Prof. Dr Cláudio C. Oliveira

Resumo

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento e a aplicação de método analítico envolvendo sistema de análise por injeção sequencial (SIA) e pervaporação para quantificação de aminoácidos em hidrolisado de proteína. A determinação quantitativa dos aminoácidos foi realizada através do monitoramento de CO₂ liberado durante reação de derivatização com ninhidrina. O gás produzido, convertido a eletrólito, foi monitorado por detector eletroquímico, sendo todas as etapas do processo executadas automaticamente por comandos programados via computador. Durante a validação do método este se mostrou linear, preciso e seletivo. A linearidade foi testada na faixa de 0,5-3,5 mmol L⁻¹, com R² > 0,991. A repetibilidade apresentou valor de dpr de 4,83. O método foi aplicado à solução de aminoácidos isolados e em hidrolisado bruto de proteína de soja, sendo o último para determinação do conteúdo de aminoácidos em proteína. Resultados obtidos através do método proposto e do método tradicional de Kjeldahl aplicados à quantificação de aminoácidos em proteína concentrada de soja comercial foram comparados e apresentaram valores próximos de teor de aminoácidos, em média de 70,03 g/100 g e 72,79 g/100 g de amostra, respectivamente. O tempo de análise para quantificação em SIA foi de 5 min a partir do hidrolisado da proteína.

**Development of analytical method to determination of amino acids composition
in soybean protein by SIA system with pervaporation**

Author: Mirian Suellen Camargo Pedroso

Adviser: Prof. Dr Cláudio C. Oliveira

Abstract

In this work is proposed the development and application of an analytical method using sequential injection analysis (SIA) and pervaporation to quantify amino acid in protein hydrolyzed. The quantitative determination of the amino acids was carried out by monitoring the CO₂ released during ninhydrin derivatization reaction. The produced gas, converted to electrolyte, was monitored by electrochemical detector, and all the process steps were performed automatically by programmed commands by computer. During validation the method it was proved to be linear, accurate and selective. The linearity was tested in the range of 0.5-3.5 mmol L⁻¹, with R² > 0.991. The repeatability presented rsd 4.83. The method was applied to analysis isolated amino acid in solution and in hydrolyzed crude of soybean protein, being this latter for determination of amino acid content of protein. The results obtained by the proposed method were compared to those obtained by Kjeldahl traditional method in the AAs quantitation in market soy protein concentrates and produced value close to aminoacids assay, 70.03 g/100 g and 72.79 g/100 g of sample, respectively. The time of quantification by SIA method was 5 min from the hydrolyzed protein.

1. INTRODUÇÃO

Análise da composição de aminoácidos (AAs) em proteínas corresponde a uma das mais importantes determinações nas áreas da biomedicina, clínica, alimentos, histoquímica, microbiologia, nutrição e estudo de plantas. A relevância do estudo se deve às atividades biológicas realizadas pelas proteínas na manutenção dos seres vivos, onde desempenham atividades imunológicas, de construção e reparo de tecidos, reguladoras, como hormônios e etc (BARRET & ELMORE, 1998); (FRIEDMAN, 2004).

Entre as técnicas utilizadas atualmente na análise da composição de aminoácidos o método de Kjeldahl, de 1883, corresponde a um dos mais antigos (American Association of Cereal Chemists, 1995). A sua permanência nos dias atuais se deve, principalmente, à rapidez e baixo custo da análise sem necessidade de tratamento da amostra. O princípio da análise que, envolve decomposição da matéria e determinação de nitrogênio liberado, tem por maior desvantagem problemas de interferentes de matriz em amostras com alto teor de nitrogênio não advindo de aminoácidos proteicos.

Nas últimas décadas inúmeros métodos de análise de aminoácidos têm sido desenvolvidos (FRIEDMAN, 2004); (HARDING & WARENFORD, 1916); (MACFADYEN & FOWLER, 1950); (YEMM & COCKING, 1955); (MAKKAR, DAWRA, & SINGH, 1987); (MARKS, BUCHSBAUM, & SWAIN, 1985); (MAKKAR, DAWRA, & SINGH, 1987). Para estas aplicações no estudo de aminoácidos em proteínas, todas as propostas, similar ao que ocorre para o método de Kjeldahl, faz-se necessário que os aminoácidos estejam livres em solução para sua quantificação. Deste modo, para atingir este resultado, processos de hidrólise são geralmente aplicados. Após a hidrólise, alguns destes métodos necessitam de tratamento da amostra antes de sua determinação quantitativa, como exemplo processos extrativos, derivatizações e separação cromatográfica. As inúmeras etapas analíticas e o uso de equipamentos de alto custo tornam estes métodos inviáveis, dependendo do objetivo da análise. Para análise da composição de aminoácidos, quando se objetiva apenas determinar a porção de amostra correspondente em proteína, os métodos rápidos e de baixo custo têm maior aceitação.

Em 1910, Siegfried Ruhemann descobriu a reação positiva de ninhidrina com aminoácidos para produção de um composto de cor púrpura (dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina), CO₂ e aldeído. O primeiro produto da reação mencionado pode ser

determinado por análise espectrofotométrica e indicar a concentração de aminoácidos na amostra (MACCALDIN, 1960). Esta forma de determinação de aminoácidos segue o exemplo do método de Kjeldahl ao que se refere às vantagens e desvantagens, sendo relativamente rápido e de baixo custo; apresentando, entretanto, baixa seletividade, pois a ninhidrina reage com outras substâncias nitrogenadas produzindo a mesma coloração (FRIEDMAN, 2004).

Para os métodos que utilizam a reação ninhidrina com aminoácidos as inovações apresentadas ao longo dos anos são mais frequentes que aquelas apresentadas para o método de Kjeldahl. Os resultados das inovações envolvendo processos de separação cromatográfica pré- e pós-coluna (STARCHER, 2001), demonstram aumento na seletividade do método, porém o uso de processos cromatográficos limita a carga de matriz na amostra e torna o processo custoso.

Neste sentido, a substituição de técnicas de separação cromatográficas por não cromatográficas (pervaporação, diálise, etc) apresentam vantagens, possibilitando aumento da seletividade sem as limitações impostas pelas técnicas cromatográficas, desde que respeitado os princípios de separação envolvidos.

O sistema de análise de injeção sequencial (SIA) com pervaporação permite análise automática ou semi-automática de compostos voláteis produzidos em reações ou presentes em solução. A análise em fluxo automatiza a determinação, reduz os erros analíticos inseridos por operações humanas e aumenta a frequência analítica, tornando o método mais rápido quando comparado aos convencionais, Kjeldahl e ninhidrina-aminoácido (espectrofotométrico).

A pervaporação inova o método de reação ninhidrina com aminoácidos, separa o CO₂ dos demais componentes de matriz e permite assim, quantificar aminoácidos sem tratamento prévio da amostra, contribuindo com a rapidez do método e seu baixo custo.

Desta forma, a análise da composição de aminoácidos em proteínas pode ser realizada através da reação ninhidrina com aminoácidos de forma rápida, semi-automática, com baixo custo e maior seletividade quando comparado ao método espectrofotométrico, sendo esta a hipótese da presente dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aminoácidos comuns

Aminoácidos comuns (AAs) correspondem a um grupo específico constituído por 20 L-aminoácidos (Fig. 1) caracterizados pela presença simultânea dos grupos funcionais amino (-NH₂) e ácidos (-COOH). Estas moléculas podem ser encontradas em diversas fontes de origem vegetal ou animal, estando presentes na forma “livre” ou polimerizada, como peptídeos e proteínas (BARRET & ELMORE, 1998).

Os aminoácidos comuns são divididos em essenciais e não essenciais. O termo “essencial” difere de espécie para espécie, de acordo com a necessidade do organismo em ingerir certos aminoácidos que não podem ser sintetizados pelo próprio organismo e, que são utilizados na síntese de suas proteínas. Os aminoácidos essenciais para os humanos são os L-enantiômeros de leucina, valina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, fenilalanina, histidina e triptofano. Por meio destes aminoácidos ocorre a síntese dos demais aminoácidos comuns, sendo estes demais classificados como “não essenciais”.

Tabela 1. Aminoácidos comuns

Nome	Símbolo		Essencial para humanos
	3 letras	1 letra	
Aminoácidos ácidos			
Ácido Aspártico	Asp	D	Não
Ácido Glutâmico	Glu	E	Não
Aminoácidos neutros			
Alanina	Ala	A	Não
Aspargina	Asn	N	Não
Cisteína	Cys	C	Não
Glutamina	Gln	Q	Não
Glicina	Gly	G	Não
Isoleucina	Ile	I	Sim
Leucina	Leu	L	Sim
Metionina	Met	M	Sim
Fenilalanina	Phe	F	Sim
Serina	Ser	S	Não
Treonina	Thr	T	Sim
Triptofano	Try	W	Sim
Tirosina	Tyr	Y	Não

Valina	Val	V	Sim
Aminoácidos Básicos			
Arginina	Arg	R	Sim
Histidina	His	H	Sim
Lisina	Lys	K	Sim
Iminoácido			
Prolina	Pro	P	Não

(COOPER, PACKER, & WILLIAMS, 2000)

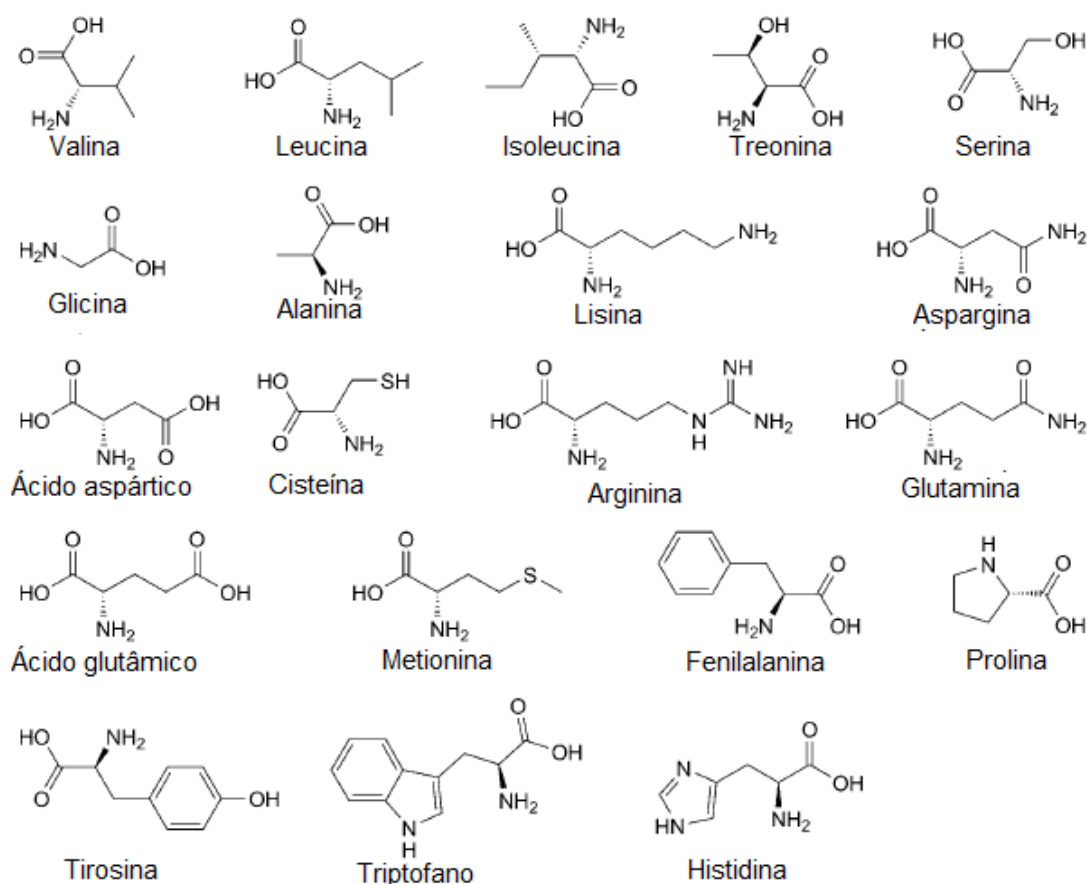


Figura 1. Estrutura dos aminoácidos comuns.

2.2 Análise da composição de aminoácidos comuns

Devido à importância dos AAs em suas mais variadas fontes e formas de apresentação, pesquisas de desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de AAs são frequentemente realizadas. Métodos envolvendo processos de derivatização (MOULIN, DELEU, LARHER, & BOUCHEREAU, 2002); (IWASW, OZAWA, IKUTA, & ONO, 1995), pré-separação em colunas de troca-iônica (FRIEDMAN &

NOMA, Methods and problems in chromatographic analysis of sulfur amino acids, 1975); (LE BOUCHER, CHARRET, COUDRAY-LUCAS, GIBOUDEAUS, & CYNOBER, 1997) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrofotometria UV-Vis (IWASW, OZAWA, IKUTA, & ONO, 1995), por espalhamento de luz, ELSD (do inglês Evaporative Light Scattering Detector) (PENNANEC, PETRITIS, & DREUX, 2004), ou cromatografia em camada delgada (CCD) (BARRET & ELMORE, 1998) estão entre os mais utilizados.

2.3 Derivatização com ninhidrina

Grande parte das técnicas analíticas utilizadas na quantificação dos aminoácidos requer processos de derivatização. Métodos de quantificação envolvendo espectrofotometria UV-Vis requerem esta etapa, uma vez que a maioria dos aminoácidos, exceto tirosina, fenilalanina e triptofano, não absorvem significativamente a radiação eletromagnética na região do UV (200-400 nm). Os grupos cromóforos amino, carboxil e amida presentes nos aminoácidos, possuem baixa absorvidade molar (ϵ) nesta faixa do espectro-eletromagnético (BARRET & ELMORE, 1998), não oferecendo sensibilidade apropriada à técnica.

Em métodos que utilizam a derivatização com o objetivo de tornar os AAs detectáveis por espectrofotometria UV-Vis, uma das reações amplamente utilizadas é a derivatização de aminoácidos com ninhidrina (ELFAKIR, 2005).

A reação de AAs com ninhidrina produz o composto dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina, (DYDA - do inglês diketohydrindylidene-diketohydrindamine) de $\lambda_{\text{máx}}$ 570 nm e $\epsilon = 22000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (WEST, 1965). A reação foi descoberta em 1910, por Siegfried Ruhemann, sendo o composto também conhecido como púrpura de Ruhemann (RP) (MACCALDIN, 1960).

Estudos da reação de ninhidrina com aminoácidos (HARDING V. J., 1916); (MACFADYEN & FOWLER, 1950); (YEMM & COCKING, 1955), aminas (MARKS, BUCHSBAUM, & SWAIN, 1985), amidas (HARDING & WARENFORD, 1916), proteínas, peptídeos (MARKS, BUCHSBAUM, & SWAIN, 1985); (MARKS, GLYPHIS, & LEIGHTON, 1987); (MAKKAR, DAWRA, & SINGH, 1987) e mesmo a determinação de amônia em solução (HARDING & WARENFORD, 1916), especialmente, nas áreas de biomedicina, clínica, alimentos, forense, histoquímica,

nutrição e no estudo de plantas, são realizados constantemente em laboratórios do mundo todo (FRIEDMAN, 2004).

Quando o objetivo da análise é quantificar individualmente cada aminoácido livre em uma solução contendo vários AAs, a derivatização com ninhidrina apresenta dificuldades, pois todos os aminoácidos, com exceção da prolina e lisina (FRIEDMAN, 2004), reagem com ninhidrina produzindo o composto RP. Desta forma, sem um processo de pré-separação (exemplo: cromatografia) antes da etapa de detecção, não é possível a determinação individual dos resíduos; restando apenas a possibilidade de se determinar a quantidade total de aminoácidos presentes na amostra (STARCHER, 2001).

Além disso, a reação de ninhidrina com uma variedade de outras substâncias afeta a seletividade dos métodos analíticos espectrofotométricos para AAs. Substâncias tais como, iminoácidos (ácido piperídico, prolina), aminas aromáticas (alanina), ácidos nucleicos (citosina, guanina), aminoácidos polifuncionais (arginina, asparagina, cisteína, triptofano), além de frutose, ácido levulínico, ácido sialílico e íons cianeto; também reagem com ninhidrina (FRIEDMAN, 2004). Algumas destas substâncias são encontradas em amostras de origem vegetal e animal.

Deste modo, análises como as de determinação do conteúdo de aminoácidos em proteínas ou aminoácidos livres em extrato bruto sofrem interferência quando o método espectrofotométrico é empregado.

Uma das vias para se melhorar a seletividade do método de derivatização de AAs com ninhidrina é realizar a quantificação através do monitoramento dos outros produtos da reação, CO_2 e aldeídos (RCHO).

Segundo o mecanismo da reação (Fig. 2) (FRIEDMAN, 2004), o aldeído é formado em um processo de hidrólise que ocorre após a etapa de descarboxilação, sendo os processos essencialmente irreversíveis (FRIEDMAN, 2004).

O aldeído formado é um produto único para cada aminoácido, durante a reação com ninhidrina, o aldeído produzido dependerá da cadeia lateral (ramificação $-R$) do aminoácido e sua produção segue estequiometria 1:1 (STARCHER, 2001). Embora esta singularidade contribua para a quantificação individual dos AAs em uma mistura, esta forma de quantificação é pouco utilizada devido às dificuldades impostas pelas propriedades físico-químicas e químicas destes compostos. A grande diferença do ponto de ebulição, P.E., entre os aldeídos mais voláteis, exemplo formaldeído, volátil a

temperatura ambiente, e os de baixa volatilidade, dificultam a utilização de uma única técnica de separação para esta classe de compostos.

Assim, técnicas como a cromatografia em fase gasosa, somente pode ser empregada na separação de alguns destes aldeídos (ZLATKIS, ORÓ, & KIMBALL, 1960). Outro problema refere-se às reações paralelas da ninhidrina com aldeídos (FRIEDMAN, 2004), o que dificulta a elaboração de método analítico único para a quantificação dos principais aminoácidos.

O CO₂, também produzido na reação, não possibilita a quantificação individual de cada aminoácido sem que haja processos de pré-separação, assim como visto para o composto RP. No entanto, quando este é o produto da reação a ser quantificado, a seletividade do método pode se tornar mais pronunciável do que a quantificação espectrofotométrica. O CO₂ provem do grupo ácido do AA e é liberado durante o estabelecimento da ligação de ninhidrina com o grupo amino do AA. Outra vantagem do uso de CO₂ refere-se às análises de AAs em que as amostras possuam componentes de matriz; tais como, açúcares (frutose, glicose) (MAGNÉ & LARHER, 1992), pigmentos (clorofila) e compostos nitrogenados (nitratos, nitritos e amônia) (LOURENÇO, BARBARINO, DE-PAULA, PEREIRA, & MARQUEZ, 2002), que em sua forma livre ou condensada com ninhidrina apresentam absorção da radiação na região do UV-Vis.

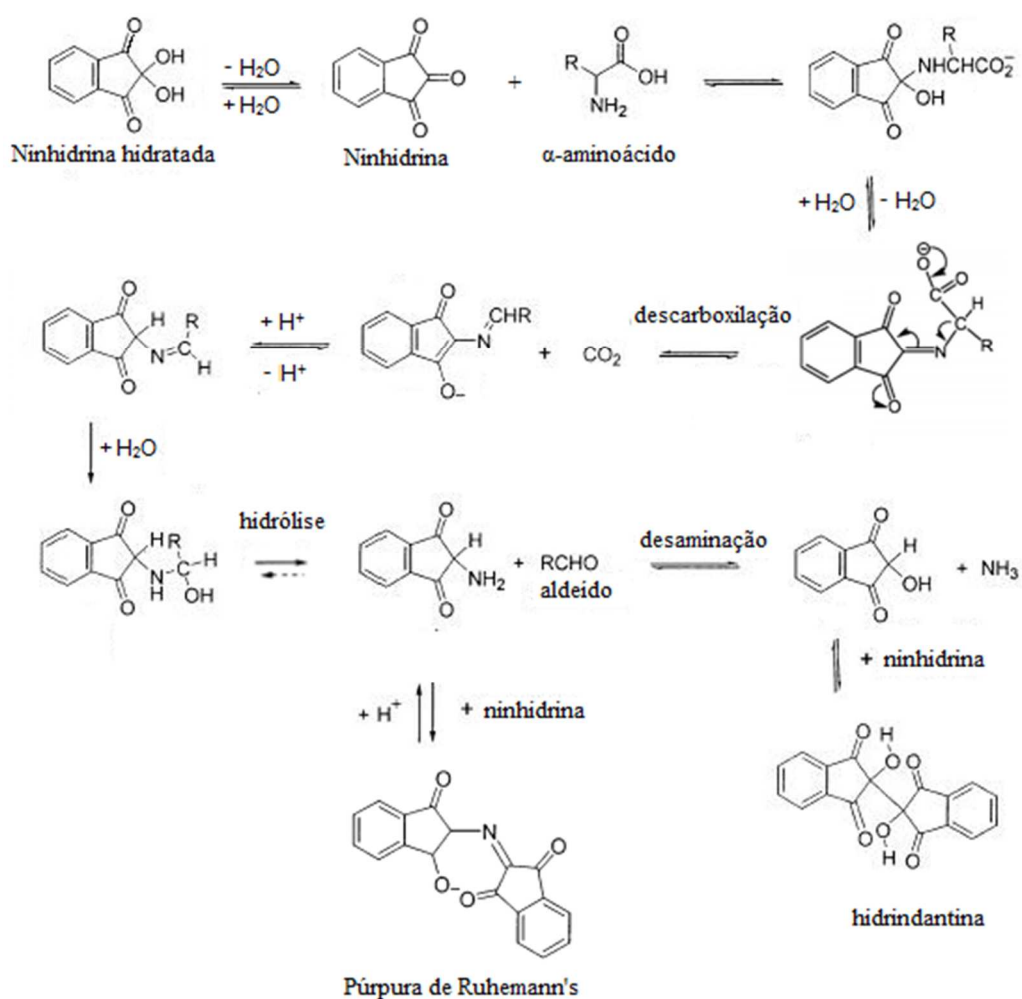


Figura 2. Mecanismo da reação de α -aminoácidos com ninhidrina

Apesar das vantagens da quantificação de CO_2 sobre a de RP, ambos produzidos na reação de AAs com ninhidrina, o número de publicações de metodologias analíticas envolvendo o primeiro produto é bastante reduzida. Os poucos métodos existentes utilizam técnicas titrimétricas (SLYKE, MACFADYEN, & HAMILTON, 1941); (SMITH & AGIZA, 1951), com baixa frequência analítica (6 amostra/hora), baixa sensibilidade (evolução mínima de 0,15 mg de CO_2) e alto consumo de ninhidrina por amostra (50 mg). Estes métodos são antigos e de difícil reprodução, pois tratam de amostras gasosas e de métodos de titulação demorados, tornando-os inviáveis para análises de rotina.

2.4 Proteínas

Proteínas ou polipeptídeos são longas estruturas poliméricas de peptídeos formados pela condensação de moléculas de α , β e γ -aminoácidos (BARRET & ELMORE, 1998).

As proteínas são essenciais para todas as formas de vida. No corpo humano estas macromoléculas realizam tarefas como construção e reparação dos tecidos; transporte de nutrientes; contrações musculares; fornecimento de energia; manutenção da saúde da pele, cabelos e unhas; proteção e regulação do organismo, sendo estas as principais moléculas com função imunológica, enzimática e hormonal (BARRET & ELMORE, 1998); (The Role of Protein in Humans: How Proteins Help Maintain Life).

A síntese destas macromoléculas ocorre dentro das células. Os aminoácidos presentes no citoplasma são capturados pelo RNAt e organizados por ação ribossômica em sequências específicas, de acordo com o código genético. Entre os mais de 700 aminoácidos conhecidos apenas um grupo de 20 L-aminoácidos, 19 aminoácidos e 1 iminoácido, participam da síntese proteica em células humanas. Devido a esta função específica, este grupo de aminoácidos é distinguido dos demais por alguns autores como aminoácidos comuns, codificados ou de proteína (BARRET & ELMORE, 1998).

2.5 Análise da composição de aminoácidos em proteínas

Análise da composição de aminoácidos é uma técnica clássica utilizada na determinação do conteúdo de proteínas. A técnica se baseia na ideia de que a composição de aminoácidos e o número de resíduos individuais presentes em um polipeptídeo são característicos de cada peptídeo e proteína. Com a incorporação dos analisadores automáticos, o método tem sido uma parte importante no estudo das proteínas, demonstrando grande aplicação na área de bioquímica, análise de alimentos, microbiologia, clínica, estudos de diagnósticos e estudos de controle de qualidade de proteínas com fins farmacêuticos, sendo indispensável na identificação e quantificação destas macromoléculas (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

A determinação da composição de polipeptídeos é um processo analítico geralmente consistindo de duas etapas, hidrólise completa do substrato para liberação dos resíduos, seguida da quantificação dos aminoácidos liberados.

2.5.1 Etapa 1: Hidrólise de proteínas

Hidrólise é uma etapa importante e seu bom desempenho é pré-requisito para o sucesso da análise. Estudos comparativos costumam apresentar erros no desempenho da hidrólise que, são os principais responsáveis pelas variações na determinação dos compostos.

Melhorias que resultam em maior sensibilidade, precisão, quantificação residual, velocidade e automação das análises são frequentemente reportadas (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998); (JOERGENSEN & THESTRUP, 1995); (PECAVAR, PROSEK, FERCEJ-TEMELJOTOV, & MARSEL, 1990); (BAXTER, et al., 2007); (WEISS, MANNEBERG, JURANCILLE, LAHN, & FOUNTOULAKIS, 1998). Os desenvolvimentos mais importantes são: O uso da radiação micro-ondas para hidrólise de amostras; a contínua substituição da clássica troca iônica por análises em cromatografia com fase reversa e; a aplicação da análise da composição de aminoácidos na identificação de proteínas em larga escala. No entanto, para determinação dos resíduos de aminoácidos gerados durante a etapa de hidrólise, métodos clássicos de quantificação de aminoácidos são utilizados em sua grande maioria.

O princípio da hidrólise de proteínas consiste na liberação quantitativa de todos os aminoácidos no substrato através da quebra das ligações peptídicas por meio de processos químicos ou bioquímicos.

Alguns fatores podem afetar o processo completo de hidrólise, tais como temperatura, tempo, agente hidrolisante e aditivos. A combinação destes fatores é crítica para a determinação dos resíduos e, suas influências são largamente investigadas por “tentativa e erro”. É relativamente fácil obter uma análise exata da mistura de padrões de aminoácidos ou de um peptídeo de cadeia curta após a hidrólise, mas é muito difícil obter resultados exatos na análise de uma proteína real após sua hidrólise. Devido à dificuldade de se determinar o teor de proteínas em amostras, muitos trabalhos buscam desenvolver etapas de purificação e transformação reprodutíveis para a quantificação destas macromoléculas (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

O grande número de amostras diversificadas que são usualmente analisadas em laboratório torna a escolha do método de hidrólise adequado dependente do objetivo principal da análise em particular. A hidrólise pode ser realizada por via química (hidrólise ácida ou básica) ou bioquímica (hidrólise enzimática). Em sua maioria, as condições ácidas demonstram preferência.

Tabela 2. Agentes utilizados em hidrólise ácida de proteínas

	Agente hidrolisante	Condições da hidrólise	Aditivos	Resíduos determinados pelo método
1	HCl 6 mol.L ⁻¹	110°C, 24 h	Fenol 0,02%	Todos os resíduos exceto Cys e Try
2	HCl 6 mol.L ⁻¹ ou Ácido Metanossulfônico (AMS) 4 mol.L ⁻¹	110°C, 24 h	Azida de Sódio	Cys
3	HCl 6 mol.L ⁻¹	110°C, 18 h	Ácido Tioglicólico 5%, Fenol 0,1%, ácido 3,3-Ditiodipropionico	Cys
4	HCl 6 mol.L ⁻¹	145°C, 4 h	Amostras previamente oxidadas com Ácido Perfórmico	Cys, Met, Lys
5	AMS 4 mol.L ⁻¹	145°C, 4 h	3-(2-Aminoetil)Indol	Try, Sulfóxido de Metionina
6	AMS 4 mol.L ⁻¹	115°C, 22 h	Amostras previamente alcalinizadas com Triptamina	Todos os resíduos
7	AMS 4 mol.L ⁻¹	160°C, 45 min		Todos os resíduos
8	AMS 4 mol.L ⁻¹	150°C, 90 min	Oxidação com Ácido Perfórmico a 50 °C por 10 min	Todos os resíduos
9	Ácido p-Toluenosulfônico 3 mol.L ⁻¹	150°C, 90 min		Sulfóxido de metionina
10	HCl:Ácido Propionico (1:1) 12 mol.L ⁻¹	150°C, 90 min		Peptídeos ligados a resinas
11	HCl:Ácido Propionico (1:1) 12 mol.L ⁻¹	Micro-ondas 840 w, 1-7 min		Peptídeos ligados a resinas
12	Ácido p-Toluenosulfônico	Micro-ondas, 15 min		Peptídeos ligados a resinas
13	DCI	Micro-ondas em potência media, 30 min		Resíduos sensíveis
14	Ácido Mercaptoetanosulfônico 2,5 mol.L ⁻¹	176°C, 12,5 min		Cys, Try
15	HCl:TFA (6:3) 6 mol.L ⁻¹	120°C, 16 h	Ácido Ditioglicólico, Fenol 1%	Cys
16	HCl			Try

17	HCl	110°C, 24 h	β -Mercaptoetanol 0,4%	Try
18	HCl	166°C, 25 min ou 145, 4 h	Fenol 3%	Try
19	HCl	145°C, 4 h	Triptamina	Try
20	HCl 6 mol.L ⁻¹	145°C, 4 h (fase gasosa)	Triptamina, 3-(2- Aminoetil)Indol, Ácido tioglicólico 5%	Try
21	TFA:HCl (1:2)	166°C, 25-50 min	Ácido tioglicólico 5%	Try, Met
22	HCl 7 mol.L ⁻¹ , TFA 10%		Ácido tioglicólico, Indol	Try
23	Ácido Mercaptoetanossul- fônico	176°C, 25 min (fase gasosa)		Try

(FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998)

2.5.1.1 Hidrólise com ácido clorídrico

O tratamento com ácido clorídrico é o método mais utilizado em hidrólise ácida. As propriedades físico-químicas deste reagente permitem a realização da hidrólise tanto em fase líquida como gasosa, podendo este ser eliminado da solução por evaporação após o tratamento. Deste modo, o hidrolisado pode ser reconstituído em volume reduzido de tampão e a análise realizada com uma pequena quantidade de substrato, um fator crítico e limitante na avaliação da determinação de algumas proteínas.

A hidrólise ácida convencional utiliza como agente hidrolisante HCl 6 mol.L⁻¹. A amostra é aquecida a uma temperatura de 110°C em vácuo por 20 a 24 h (WEISS, MANNEBERG, JURANCILLE, LAHN, & FOUNTOULAKIS, 1998). Sob estas condições, os aminoácidos asparagina e glutamina são completamente hidrolisados para ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente. Triptofano é completamente destruído e cisteína não pode ser determinada diretamente. Tirosina é parcialmente destruída por traços de impureza presentes no agente hidrolisante. Serina e treonina são parcialmente hidrolisadas, sofrendo perda de 10 e 5%, respectivamente. Para os dois últimos aminoácidos, fatores de correção podem ser empregados se for desejada uma quantificação exata (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

Darragh et al. reproduziram por diversas vezes o método de hidrólise com HCl 6 mol.L⁻¹ a 110°C, variando o tempo de hidrólise de 2 a 141 h, com objetivo de avaliar a perda de aminoácidos durante a hidrólise ácida. As maiores perdas foram observadas para cisteína e serina (DARRACH, GARRICK, MOUGHAN, & HENDRIKS, 1996).

Agentes protetores, tais como fenol, ácido tioglicólico, mercaptoetanol, indol ou triptamina, são adicionados à amostra para reduzir a perda de vários destes resíduos durante a hidrólise.

A sequência dos aminoácidos no substrato é crítica para o resultado da hidrólise. A cadeia alifática dos aminoácidos causa impedimento estérico e estruturas terciárias das proteínas afetam o grau de desdobramento. Os resíduos com maior grau de dificuldade para quebra de suas ligações são os que possuem aminoácidos alifáticos, tais como os dipeptídeos de sequência Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val, os quais são particularmente resistentes à hidrólise, com rendimento de quebra de suas ligações entre 50 e 70% nas condições de hidrólise para o método ácido convencional ($\text{HCl } 6 \text{ mol.L}^{-1}$, 100°C por 24 h). Hidrólises por 92 h ou até 120 h podem ser necessárias para garantir a clivagem quantitativa destas ligações (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998). Porém, durante processos prolongados de hidrólise, muitos dos resíduos sensíveis sofrem perdas ainda maiores.

Hidrólise em fase gasosa apresenta resultados comparáveis à hidrólise na fase líquida. Em geral, elas reduzem a dependência de agentes hidrolisantes e com o uso de compartimentos especiais para este tipo de hidrólise, acomodam simultaneamente um grande número de amostras (WEISS, MANNEBERG, JURANCILLE, LAHN, & FOUNTOULAKIS, 1998).

2.5.1.2 Hidrólise com ácidos sulfônicos e outros agentes

Ácidos sulfônicos são fortes, agentes não oxidantes e encontram grande aplicação em processos de hidrólise.

A principal vantagem do uso de Ácido Metanossulfônico (MAS) em comparação ao HCl é a possibilidade de se efetuar a determinação de triptofano e sulfóxido de metionina. Triptofano é destruído durante a hidrólise convencional com HCl. Sulfóxido de metionina é facilmente gerado durante o processo de hidrólise, sendo produtos da oxidação de metionina. Chiou et al, determinaram todos os resíduos, incluindo triptofano pela aplicação de hidrólise com AMS (CHIOU & WANG, 1988).

Ácido metanossulfônico possui elevado ponto de ebulição (167°C), desta forma, não pode ser evaporado após a hidrólise e nem utilizado em hidrólise em fase gasosa. Para análises cromatográficas, os produtos da digestão no hidrolisado necessitam ser diluídos e o pH ajustado para valores próximos de 2-3, e como consequência uma

grande quantidade de amostra tem que ser utilizada para o processo (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

Hidrólise com ácido p-Toluenossulfônico 3 mol.L^{-1} a 110°C por 22 h é aplicada na determinação de sulfóxido de metionina em proteínas e alimentos em presença de outros resíduos (HAYASHI & SUZUKI, 1985). Ao utilizar estes agentes para a hidrólise, metionina e metioninas sulfônicas foram recuperadas quantitativamente, ao passo que sulfóxido de metionina foi convertida parcialmente para Metionina durante a hidrólise (aproximadamente 94%). A presença de carboidratos não afeta a reprodutibilidade do método de hidrólise (HAYASHI & SUZUKI, 1985).

2.5.1.3 Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina é exclusivamente utilizada para a análise de triptofano que é estável sob condições básicas e para amostras de proteínas contendo uma grande porcentagem de carboidratos. A principal desvantagem do método é que serina, treonina, arginina e cisteína são destruídas e outros aminoácidos formam misturas racêmicas. Hidrólise alcalina geralmente é realizada com NaOH, KOH ou mais raramente com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (BAXTER, et al., 2007).

2.5.1.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de proteínas é raramente aplicada, sendo usada com o objetivo principal de reduzir a racemização na análise de polipeptídeos. Esta forma de hidrólise tem como vantagem permitir a quantificação de aspargina e glutamina e outros resíduos sensíveis à hidrólise ácida e básica (BAXTER, et al., 2007).

2.5.1.5 Hidrólise assistida por micro-ondas

O mais significativo desenvolvimento na análise da composição das proteínas ocorrido nos últimos anos é o uso da radiação de micro-ondas em seu processo de hidrólise. Este procedimento, geralmente, é realizado em aparatos especiais para este fim. O mecanismo pelo qual o aquecimento por micro-ondas ocorre oferece certas vantagens em relação à decomposição convencional. A energia é gerada por polarização e não por colisão das moléculas. A magnitude do efeito de polarização depende do dipolo da molécula envolvida e é elevado para as moléculas de água (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

O substrato pode ser decomposto (digerido) em hidrólise no modo de fase líquida ou gasosa com HCl, AMS somente em fase líquida, ou com outros reagentes. A absorção instantânea da energia da radiação resulta em redução do tempo de hidrólise em muitas horas, geralmente o tempo necessário está na faixa de 1 a 30 min para hidrólise em fase líquida e 20 a 45 min para hidrólise em fase gasosa. A hidrólise em poucas horas representa uma das maiores vantagens do método (WEISS, MANNEBERG, JURANCILLE, LAHN, & FOUNTOULAKIS, 1998). Simultaneamente, diversos resíduos podem ser obtidos com alta produção no hidrolisado, principalmente quando são utilizadas substâncias para protetoras, tais como fenol e ácido tioglicólico, que evitam degradação dos AAs mais sensíveis ao processo de hidrólise (JOERGENSEN & THESTRUP, 1995).

Joergensen et al., hidrolisaram proteínas purificadas e proteínas de amostras reais, contendo carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e minerais com HCl em forno de micro-ondas a 150°C por 10-30 min. O resultado foi similar ao da hidrólise convencional. A adição de fenol estabiliza tirosina, fenilalanina e histidina em amostras oxidadas previamente com ácido per fórmico. Adição de ácido tioglicólico estabiliza os resíduos de metionina e triptofano (JOERGENSEN & THESTRUP, 1995).

Pecavar et al., utilizaram hidrólise em fase líquida com ácido p-Toluenossulfônico por 15 min em forno de micro-ondas caseiro, obtendo hidrólise completa dos peptídeos. O resultado foi comparado ao do método de hidrólise ácida com HCl 6 mol.L⁻¹ a 110°C por 48 h (PECAVAR, PROSEK, FERCEJ-TEMELJOTOV, & MARSEL, 1990).

2.5.1.6 Efeito dos componentes de matriz na quantificação de aminoácidos em hidrolisados

As proteínas a serem submetidas à análise de composição de aminoácidos devem ser livres de componentes tais como, tampões, íons metálicos, antibactericidas e estabilizantes que possam interferir na análise. Em algumas condições de hidrólise, estes agentes interferentes podem reagir ou catalisar reações, afetando a quantificação de alguns resíduos, em particular tirosina, metionina e histidina. Muitos dos efeitos interferentes encontrados são conhecidos e descritos na literatura (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

A presença de NaCl afeta a quantificação de tirosina. Azidas de Sódio, um agente bacteriostático, interfere na quantificação de metionina, que é parcialmente oxidada a metionina sulfônica. Simultaneamente, cisteína é oxidada a ácido cisteico. A presença de glicerol no hidrolisado afeta a quantificação de aspartato e glutamato. Estes resíduos são quantificados em apenas 6-60% em presença de glicerol (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998). Além disso, amostras de proteínas, geralmente, contêm quantidade significativa de sais de amônio ou ureia, substâncias que produzem grande quantidade de amônia durante processos de hidrólise, podendo afetar as análises cromatográficas. Carboidratos afetam a eficiência cromatográfica em métodos de separação. Desta forma, em alguns casos, um tratamento inicial da amostra pode ser necessário antes ou após a hidrólise, dependendo do processo analítico a ser empregado na quantificação dos resíduos. Entre os tratamentos conhecidos estão a diálise, ultrafiltração, precipitação com solventes orgânicos (exemplo: precipitação com acetona acidificada com HCl 0,2% ou ácido trifluoracético). A precipitação com acetona acidificada remove sais, glicerol e detergentes (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

2.5.2 Etapa 2: Determinação do conteúdo de aminoácidos em hidrolisados de Proteína

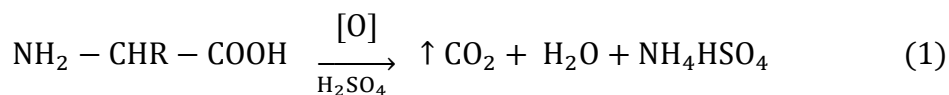
Após a realização da hidrólise completa, o estudo da composição dos AAs em proteína pode ser efetuado pela aplicação do método escolhido para quantificação dos AAs livres, conforme os métodos já mencionados para análise de aminoácidos. A escolha do método deve ser feita considerando os interferentes existentes na amostra e a frequência analítica desejada. O aumento da frequência analítica pode ser alcançado pela utilização de analisadores automáticos ou semi-automáticos, onde sistemas de injeção em fluxo podem contribuir para esta melhoria. A seletividade pode ser melhorada com técnicas de separação cromatográficas ou não cromatográficas.

2.5.2.1 Determinação do conteúdo de Proteína por Método de Kjeldahl.

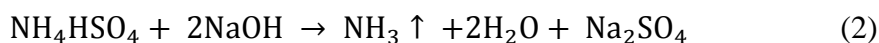
Em 1883, Johan Kjeldahl propôs um método de análise para determinação do conteúdo de nitrogênio de proteínas presente em amostras de cerveja (American Association of Cereal Chemists, 1995). O método foi considerado o mais rápido e preciso da época. Ao longo dos anos algumas alterações foram aplicadas, porém os princípios básicos da técnica ainda se mantêm nos dias atuais.

O método pode ser dividido em três etapas, digestão (decomposição), destilação e titulação.

Na primeira etapa (eq. 1) ocorre a digestão da amostra com ácido sulfúrico para produzir sulfato de amônio, dióxido de carbono e água. Este processo ocorre em temperatura próxima ao ponto de ebulição do ácido sulfúrico (279,6°C). Aparatos especiais com refluxo são necessários para prevenir a perda de material e vapores de água durante esta etapa. Dependendo da eficiência da decomposição sais de potássio podem ser adicionados para aumentar o ponto de ebulição da solução ácida e catalisar a reação. Agentes oxidantes, tais como ácido perclórico ou permanganato de potássio também têm sido utilizados na decomposição.

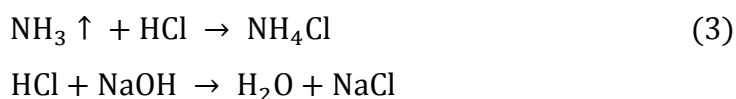


A segunda etapa (eq. 2) envolve a destilação da amônia. A solução de ácido sulfúrico contendo a amostra é alcalinizada com uma solução básica concentrada de NaOH, liberando amônia. A saída do tubo condensador é imersa em uma solução ácida de modo a dissolver o gás nesta solução.



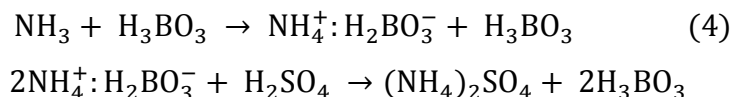
Na terceira etapa ocorre a titulação da solução ácida com íons amônio dissolvidos. A titulação pode ser direta ou indireta, dependendo da solução ácida que irá funcionar como receptor do gás de amônia.

Para titulação indireta (eq. 3), geralmente, são escolhidas soluções ácidas padronizadas de HCl ou H₂SO₄, a dissolução de amônia nestas soluções irá gerar cloreto de amônio e sulfato de amônio, respectivamente. O excesso de ácido é então titulado com uma solução básica padronizada.



Na titulação direta (eq. 4), a amônia é dissolvida em uma solução de ácido bórico, produzindo borato de amônio e alteração de cor da solução. A solução é então

titulada com ácido clorídrico ou sulfúrico padronizado, deslocando o equilíbrio para formação de cloreto ou sulfato de amônio (American Association of Cereal Chemists, 1995); (Pharmacopeia, 2009).



Após a titulação da amostra, seja por método direto ou indireto, o volume gasto de titulante indicará a quantidade de nitrogênio percentual (N%) na amostra por meio da equação descrita abaixo.

$$N(\%) = \frac{V \times N \times f \times 14}{m_a} \quad (5)$$

Em que:

$N(\%)$: corresponde ao percentual de nitrogênio na amostra;

V : Volume gasto da solução titulante (mL);

N : Normalidade teórica da solução titulante;

f : fator de correção da solução titulante (obtido pela padronização da solução);

14: fator de conversão de Normalidade para correspondente em massa de nitrogênio;

m_a : massa da amostra bruta (mg);

Após o cálculo do nitrogênio percentual, o conteúdo de proteína na amostra é então estimado pela aplicação de um fator conhecido como “fator de conversão de nitrogênio de proteína (N:P)”. Resumidamente, em análise de proteínas, o quantitativo de nitrogênio provem dos AAs que constituem o polipeptídeo, e corresponde a aproximadamente 16% da massa total da proteína, ou de seus AAs, os outros 84% correspondem a massa das cadeias laterais e dos grupos de ácidos carboxílicos presentes em sua estrutura. Deste modo, com os dados do nitrogênio percentual na amostra $N(\%)$, obtidos na titulação, juntamente com o fator de conversão de nitrogênio de proteína (N:P), torna-se possível a estimativa da quantidade de proteína na amostra bruta (SALO-VAANANEN & KOIVISTOINEN, 1996).

2.5.2.2 Fator de conversão de nitrogênio de proteína (N:P)

O fator de conversão de nitrogênio de proteína (N:P) corresponde à razão entre a massa da proteína e a massa de nitrogênio presente nesta. Este fator permite estimar o teor de proteína presente em amostras por simples análise de nitrogênio total.

O fator de conversão tradicional assume que as proteínas contêm em média 16% de nitrogênio e que a amostra analisada não apresenta quantidade significativa de nitrogênio proveniente de outras substâncias (LOURENÇO, BARBARINO, DE-PAULA, PEREIRA, & MARQUEZ, 2002). Deste modo, 1000 g de proteína animal ou vegetal contém 160 g de nitrogênio (N), resultando no fator de conversão 6,25 ($1000/160 = 6,25$).

Algumas particularidades da amostra devem ser consideradas durante a análise de composição de proteínas pela aplicação do fator de conversão. Sem estas considerações, estimativas incorretas podem ser obtidas. O fator N:P considera que o nitrogênio total determinado é derivado exclusivamente das proteínas. No entanto, algumas amostras como exemplo as plantas, apresentam considerável teor de nitrogênio advindo de outras substâncias tais como ácidos nucleicos, aminas, ureia, amônia, nitratos, nitritos, vitaminas, alcaloides, fosfolipídios e glicosídeos nitrogenados (FUJIHARA, KASUGA, & AOYAGI, 2001), podendo causar super estimação do conteúdo de proteínas.

Em frutos, o erro está na faixa de 33% a 76% (LEVEY, BISSEL, & O'KEEFE, 2000). Além dos problemas com interferentes, o conteúdo de nitrogênio de proteína varia de uma proteína a outra. É comum encontrar plantas que apresentam menos que 16% de nitrogênio derivado da composição dos aminoácidos residuais (YEAOU & WEE, 1994). Em carnes o efeito reverso pode ser observado, elevados níveis de colágeno podem aumentar o conteúdo de nitrogênio para até 18% (SRIPERM, PESTI, & TILLMAN, 2011). Dados literários mostram que taxas diferentes de nitrogênio em proteínas isoladas de origem animal e vegetal variam de 13% a 19% (SRIPERM, PESTI, & TILLMAN, 2011).

Em amostras onde há grande concentração de nitrogênio proveniente de outras substâncias que não as proteínas, os interferentes necessitam ser quantificados por metodologia específica e posteriormente corrigidos nos cálculos. Por este motivo, alguns autores acabam por definir fatores N:P específicos para algumas amostras, normalmente valores inferiores a 6,25 (YEAOU & WEE, 1994).

Mossé et al. (MOSSÉ, HUET, & BAUDET, 1985) reportaram diversos métodos para cálculo do fator N:P. Os fatores obtidos k_A , k_P e k são resultantes destas formas variadas, onde se utiliza $\sum E_i$, $\sum D_i$ e N_L . $\sum E_i$ é a soma dos resíduos de aminoácidos em sua forma anidra (eq. 5), E_i é a massa (g kg^{-1}) de cada aminoácido em sua forma anidra contido em material seco. A massa correspondente a cada um dos aminoácidos é obtida no ensaio de doseamento e a massa da forma anidra é calculada por subtração da massa de uma molécula de H_2O para cada molécula do aminoácido. Tal correção procede pelo fato de que durante o processo de formação das proteínas uma molécula de água é eliminada para cada ligação peptídica formada (YEAOU & WEE, 1994).

$$\sum E_i = AA_i \times \frac{AA_{i(MM)} - \text{H}_2\text{O}}{AA_{i MM}} \quad (5)$$

Onde, AA_i é a massa do aminoácido (g kg^{-1}) de material seco, obtida no ensaio do doseamento e $AA_{i MM}$ é a massa molar do aminoácido.

Os cálculos para $\sum D_i$ (eq. 6) são realizados pela soma do conteúdo de nitrogênio total presente nos aminoácidos ($AA_{i N}$), incluindo os nitrogênios das aminas ($\text{NH}_3 N$), da aspargina e glutamina que são liberados na forma de amônia durante a hidrólise ácida. D_i é a massa de nitrogênio (g kg^{-1}) para cada aminoácido no material seco.

$$\sum D_i = AA_i \times \frac{AA_{i N} - 14,007}{AA_{i MM}} + \text{NH}_3 \times \frac{\text{NH}_3 N \times 14,007}{\text{NH}_3 MM} \quad (6)$$

Os fatores k_A , k_P e k são obtidos por meio das equações descritas abaixo.

$$k_A = \frac{\sum E_i}{\sum D_i} \quad (7)$$

$$k_P = \frac{\sum D_i}{N_L} \quad (8)$$

Onde N_L é o nitrogênio total da amostra.

k é o fator obtido através dos valores médio de k_A e k_P , conforme descrito por Mossé et al.:

$$k = \frac{k_A + k_P}{2} \quad (9)$$

Ambos os fatores k_A , k_P e k , quando comparados ao fator tradicional 6,25 apresentam resultados de maior exatidão em análises de quantificação das proteínas (YEAOU & WEE, 1994).

2.6 Proteína de soja

As proteínas de soja são utilizadas na alimentação humana sob a forma de farinhas, proteínas isoladas, concentradas e fibras texturizadas. Alimentos à base de soja incluem queijo, bebidas, salame, tofu e substitutos vegetarianos da carne. Nos últimos anos o consumo destes alimentos tem aumentado devido aos benefícios à saúde, comprovados em estudos científicos. Os efeitos incluem redução do colesterol no plasma, prevenção de câncer, diabetes e obesidade, e proteção contra doenças intestinais e renais (FRIEDMAN & BRANDON, Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins, 2001).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) corresponde a uma importante fonte de proteínas para nutrição humana e animal. Os grãos de soja contêm aproximadamente 48% de proteínas, as quais possuem um dos melhores conteúdos de aminoácidos encontrados nas plantas (ADACHI, TAKENAKE, GIDAMIS, MIKAMI, & UTSUMI, 2001).

Tabela 3. Composição de aminoácidos em variedades de farelos de soja

Aminoácidos	Rio Balsas ^a	Bays ^a	Williams 82 ^b
	g/16 g de N ^c	g/16 g de N	g/16 g de N
Asp	11,34	11,85	11,16
Thr	3,81	3,76	3,99
Ser	4,23	4,50	5,28
Glu	18,30	19,02	18,87
Pro	5,33	5,31	5,61
Gly	3,88	3,78	4,15
Ala	4,25	4,10	4,17
Cys	1,63	1,44	1,39
Met	1,38	1,50	1,39
Val	4,66	4,60	4,35
Ile	3,79	3,75	4,42

Leu	7,68	7,63	7,84
Tyr	5,02	4,73	3,76
Phe	6,05	5,82	4,70
His	3,04	2,90	2,53
Lys	6,55	6,63	6,20
Arg	8,52	7,97	7,16
Trp	0,54	0,69	0,71
Total	100,00	99,98	97,68

^aCultivares adaptadas as baixas latitudes brasileiras por estudos desenvolvidos pela EMBRAPA [16].

^bCultivar padrão norte americana [14].

^cRazão entre a massa do aminoácido (g) a cada 16 gramas de nitrogênio proveniente da proteína, determinado por análise de nitrogênio total.

As proteínas de soja consistem principalmente de α , β e γ -conglucina, glicinina (11S), e outras globulinas com massa molecular na faixa de 140 a 300 kDa. As sementes de soja também contêm proteínas bioativas tais como β -amilase, citocromo c, lectina, lipoxigenase, urease, inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e tripsina, além de metabólitos secundários, isoflavonas, saponinas, ácido fítico, entre outros (FRIEDMAN & BRANDON, Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins, 2001).

Glicinina, globulina 11S, uma das maiores proteínas de armazenamento encontradas nos grão de soja, corresponde a 40% do total de proteínas do grão. Esta proteína é formada por subunidades de polipeptídeos ácidos e básicos ligadas entre si por ligações de dissulfeto. Os polipeptídeos são classificados de acordo com sua sequência de aminoácidos e apresentam massa molecular aproximada de 20 a 32 kDa (ADACHI, TAKENAKE, GIDAMIS, MIKAMI, & UTSUMI, 2001). A proglicinina, uma subunidade precursora da glicinina, é representada em diagrama de fitas (Fig. 3) e a representação esquemática dos aminoácidos e suas respectivas ligações de hidrogênio para a formação desta subunidade é mostrada na Fig. 4.

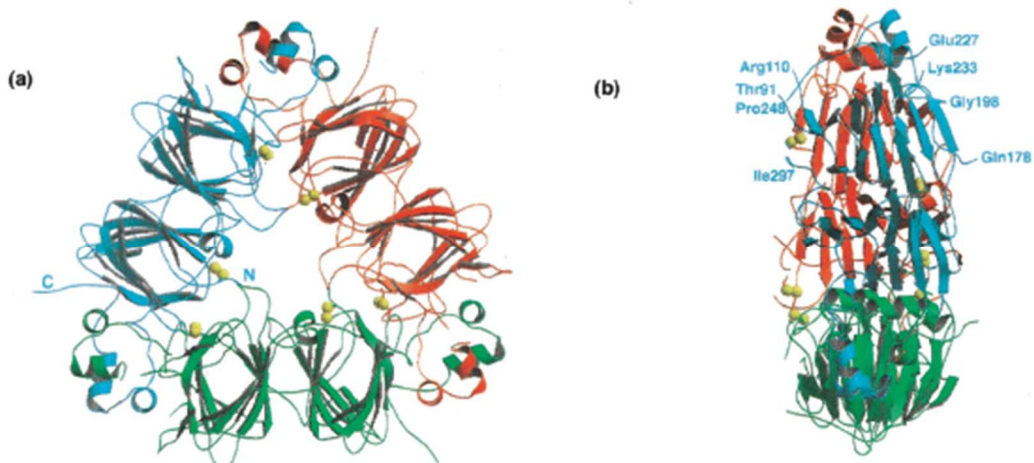


Figura 3. Diagrama de fitas de proglicinina

Na Figura 3, as cores azul, verde e vermelho indicam os três protômeros da proglicinina, sendo (a) e (b) representação em planos perpendiculares. As ligações de dissulfeto estabelecidas entre os protômeros são representadas pelas esferas em amarelo (raio da ligação 1,2 Å). N e C indicam nitrogênio e carbono terminais (ADACHI, TAKENAKE, GIDAMIS, MIKAMI, & UTSUMI, 2001).

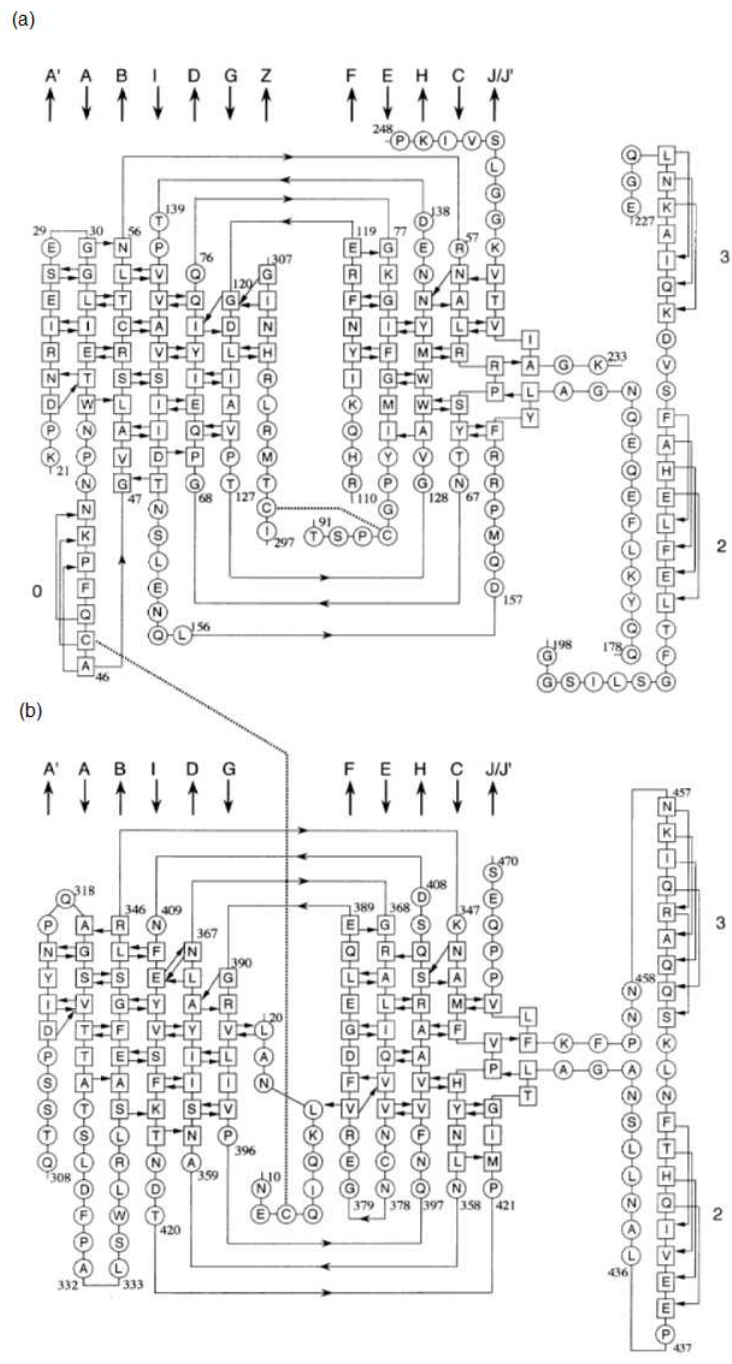


Figura 4. Diagrama esquemático de ligações de hidrogênio em protómeros de proglicinina

Na figura 4, tem-se (a) Modulo N-terminal; (b) Modulo C-terminal. Quadrados indicam resíduos compreendendo elementos estruturais secundários, enquanto os círculos indicam aqueles em regiões de interconexão e terminais. Ligações de hidrogênio entre as cadeias são representados por meio de setas com as pontas no 24

sentido ao átomo de oxigênio do grupo carboxílico. Linhas tracejadas representam ligações dissulfeto (ADACHI, TAKENAKE, GIDAMIS, MIKAMI, & UTSUMI, 2001).

2.7 Análise por injeção sequencial (SIA)

A busca por métodos analíticos com alta frequência de amostragem, baixo consumo de amostra e reagentes e um mínimo de interferência humana teve seus primeiros passos somente na metade do século XX, com a introdução dos métodos de análises químicas em fluxo, a citar trabalhos como o de Skeggs (SKEGGS, 1957), que representa o surgimento da Análise em Fluxo Contínuo Segmentado (CFA). Este sistema compreendia a premissa de um mínimo de interferência humana na análise. O objetivo de atender também as outras duas características desejadas para métodos analíticos levaram à criação posterior da Análise por Injeção em Fluxo, FIA, seguida da Análise por Injeção Sequencial, SIA (RUZICKA & MARSHALL, 1990).

Do ponto de vista evolutivo, três novos conceitos surgiram na passagem de CFA para FIA: 1. A amostra deixava de ser continuamente aspirada para o sistema em fluxo (característica do CFA), levando assim a um menor consumo da mesma; 2. As bolhas de ar empregadas em CFA para impedir a inter-contaminação entre amostras foram dispensadas (desde que os volumes de reagentes, vazões e dimensões fossem devidamente otimizados). A remoção das bolhas permitiu não só um aumento na frequência analítica, pois as mesmas não necessitavam mais ser removidas antes da chegada da zona de amostra ao detector, como também a exploração dos gradientes de concentração da zona de reação tornou-se possível; 3. Passou-se a explorar a quantificação do analito antes mesmo que a reação atingisse o equilíbrio químico, possibilitando a exploração de aspectos cinéticos (SANTOS & MASINI, 2010).

A análise por injeção em fluxo tem como conceito básico a introdução da amostra em um fluido transportador, participante ou não da reação, cuja função é deslocar a zona de amostra introduzida ao longo de todo o sistema até o detector. Os primeiros sistemas FIA empregavam uma seringa para a introdução de amostra. Dentro deste sistema, a amostra pode misturar-se aos reagentes e/ou passar por etapas de tratamento, tais como diálise ou pré-concentração do analito em suportes sólidos.

Em 1990, devido sua versatilidade, os sistemas FIA já se encontravam popularizados e largamente empregados em Química Analítica. Estes dispositivos

funcionam satisfatoriamente em laboratórios. Porém, o emprego desta forma de sistema para análises em controles de processos apresenta dificuldades, dentre as quais citadas por autores (SANTOS & MASINI, 2010); (OLIVEIRA, SARTINI, & ZAGATTO, 2000); (RUZICKA & MARSHALL, 1990): 1. a necessidade de se reconfigurar todo o aparato para novas análises; 2. a utilização de diversas bombas peristálticas simultaneamente (sistemas com quatro ou mais linhas de transmissão, comuns em FIA, requer atenção contínua do analista para a detecção de eventuais vazamentos ou variação operacionais); 3. problemas como a formação de bolhas e amostras com alta carga orgânica, proveniente da matriz, podem vir a competir com o analito e dificultam a utilização de alguns métodos de detecção, tais como espectrofotometria (OLIVEIRA, SARTINI, & ZAGATTO, 2000).

A busca por uma ferramenta projetada para o monitoramento de processos levou Ruzicka et al. (RUZICKA & MARSHALL, 1990), em pesquisas no Centro de Química Analítica de Processos da Universidade de Washington, à publicação do trabalho original sobre a análise química por injeção sequencial (SIA) que, posteriormente foi considerada a segunda geração dos sistemas de análises químicas em fluxo (SANTOS & MASINI, 2010); (OLIVEIRA, SARTINI, & ZAGATTO, 2000); (RUZICKA & MARSHALL, 1990); (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005).

Nesta nova etapa do processo evolutivo, passando de FIA para SIA, houve redução drástica no consumo de reagentes devido à introdução de fluxo programado e dotado de uma linha principal; a reprodução da dispersão na zona de injeção dentro da corrente transportadora e sincronismo da chegada da zona de amostra no detector; as possíveis operações de manipulação de soluções tais como injeção de amostra, injeção de reagentes, mistura de amostras e reagentes, lavagem de cela de detecção e condicionamento; a possibilidade da utilização de reatores e compartimentos de tratamento de amostra (que contribuem para eliminar problemas com interferentes de matriz, efetuar diluições, pré-concentração, reações, filtrações e adições de padrão em análise in-line), são as principais evoluções consideradas na literatura ; (OLIVEIRA, SARTINI, & ZAGATTO, 2000); (RUZICKA & MARSHALL, 1990); (ABATE, SANTOS, COLOMBRO, & MASINI, 2006).

Devida à simplicidade do sistema SIA, permitindo análises de controles de processo em tempo real com mínima necessidade de manutenção, reconfiguração e/ou

recalibração, com fácil adaptação para diferentes análises apenas por alteração de parâmetros de fluxo ou volumes de injeção, controlados via computador, a técnica passou a ser considerada robusta e por este motivo possui ampla aplicação nos dias atuais (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005); (ABATE, SANTOS, COLOMBRO, & MASINI, 2006).

2.7.1 Princípios e componentes básicos de SIA

Os princípios básicos de funcionamento dos sistemas SIA são os mesmos encontrados para os FIA: injeção sequencial de amostras e reagentes com volumes bem definidos, os quais penetram um no outro para uma dispersão axial e radial, permitindo a realização de uma zona combinada reproduzível (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005). A Fig. 5 mostra as partes principais de um sistema SIA comum (SANTOS & MASINI, 2010).

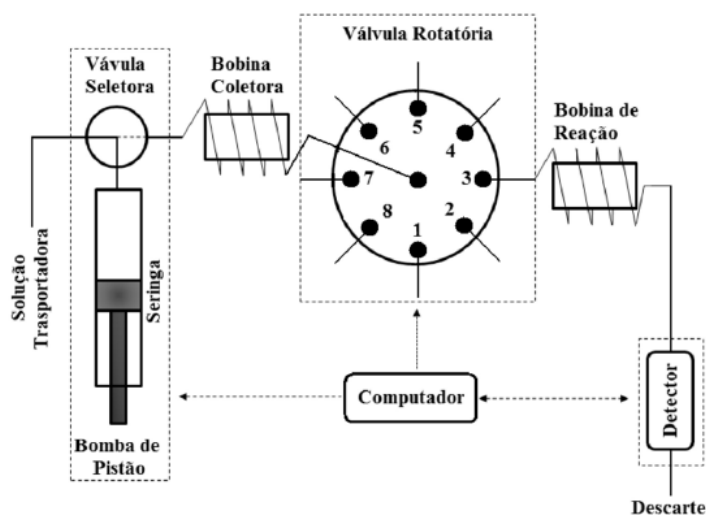


Figura 5. Esquema típico de um sistema SIA

O coração do sistema é uma válvula seletora rotatória (multiportas), cuja finalidade é permitir a comunicação entre cada uma das portas (indicadas com a numeração 1-8) através da porta central; esta porta, por sua vez, está conectada a uma bobina coletora. O objetivo desta bobina é agrupar as zonas (também chamadas de plugues) de amostra e reagentes que são aspiradas através das diferentes portas, sem que estas zonas atinjam o sistema de propulsão. Cada uma das portas pode estar associada a reservatórios de reagentes/resíduos, bobinas auxiliares, câmaras de mistura, detectores

ou outros sistemas complementares, sendo estes interconectados entre si por meio de tubos de teflon, bobinas.

Uma seringa acoplada a uma bomba de pistão é o sistema de propulsão mais comumente empregado; através de uma válvula seletora, pode-se aspirar o fluido ou solução transportadora e, posteriormente, com a válvula seletora alternada para a posição de saída, realizar toda a movimentação bidirecional de fluidos necessária para geração e registro do sinal analítico (SANTOS & MASINI, 2010).

Todo o sistema funciona automaticamente e é controlado por um computador. Inicialmente, o sistema promove a aspiração sequencial do fluxo transportado/solução de limpeza para dentro da bobina de armazenamento, e pela alteração de posicionamento da válvula seletora aspira em seguida volumes pequenos de amostras e reagentes. Após um dado intervalo de tempo pré-definido, a válvula seletora posiciona-se para a porta referente à via de acesso ao detector e o fluxo é revertido, sendo a zona da amostra direcionada a bobina de reação e ao detector. Então o ciclo analítico é completado em 3 etapas, excluindo as etapas de lavagem.

Os ciclos também podem ser constituídos de um grande número de etapas, dependendo do tipo de operações escolhidas e dos tratamentos necessários para a amostra. Este sistema de análise permite tratamentos de amostras tais como: separação gás-líquido, extração líquido-líquido, difusão gasosa, diálise, digestão por micro-ondas, precipitação/co-precipitação em reatores combinados e separação por troca iônica ou extração em fase sólida com reações em minicolunas (SANTOS & MASINI, 2010); (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005). Por esta razão, o tempo requerido para conduzir uma análise é a soma do período de reação, o período de medição do sinal e o tempo de aspiração das diferentes soluções.

2.7.2 Aplicação de sistemas SIA com detectores eletroquímicos

Muitas técnicas instrumentais podem ser teoricamente utilizadas como detectores em sistemas SIA, desde que estas atendam a características como: baixo volume de fluxo na cela de detecção (assim não ocorrerá à distorção do pico indevidamente), rápida detecção de sinais transientes, e que a distorção do sinal não seja produzida por longo período pelos componentes eletrônicos responsáveis pelo seu processamento (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005).

Assim como em sistemas FIA, o detector, frequentemente, utilizado em sistemas SIA é o espectrofotométrico (ca 50% das aplicações). A preferência por este detector deve-se à facilidade com que a célula de pequeno volume pode ser ligada a um espectrofotômetro, amplamente encontrado em qualquer laboratório; somado a maneira eficaz com que se pode conectar o coletor a este equipamento e realizar a medição de inúmeros analitos (que podem absorver na região do UV-Vis por si só ou por reações com outros reagentes específicos). No entanto, o uso de detectores eletroquímicos em sistemas SIA tem demonstrado crescente aceitação nos últimos anos (OLMOS, SOTO, ZÁCATE, ARAÚJO, & MONTENEGRO, 2005), principalmente devido a características, tais como:

- A sensibilidade da aplicação analítica não depende de uma célula de fluxo na mesma medida como a que ocorre em detecções espectrofotométricas. Neste sentido, miniaturização do sistema é facilmente atingida.

- Detectores potenciométricos são facilmente controlados em laboratórios, com baixo custo, são robustos e apresentam boa performance.

- A junção da alta sensibilidade dos detectores amperométricos com os biosensores seletivos ou imunossensores, possibilitam doseamento rápido e automático de analitos em amostras complexas como as encontradas em análises de alimentos, biológicas e farmacêuticas.

- Simplicidade da automação do procedimento a ser implantado.

- O sistema SIA também abre possibilidades para simultâneos doseamentos usando ordens de sensores eletroquímicos com detectores com alta precisão e boa exatidão.

2.8 Princípios da técnica de pervaporação

Em 1979, Baadenhuijsen et al. realizaram um dos primeiros estudos envolvendo processos contínuos de separação de compostos sem utilização de técnicas cromatográficas. Os autores utilizaram difusão gasosa acoplada a um sistema de injeção em fluxo para promover a separação de CO₂ de matriz biológica (BAADENHUIJESSEN & SEUREN-JACOBS, 1979). Os resultados obtidos neste trabalho incentivaram novas pesquisas em busca de técnicas de separação não cromatográficas.

Nos dias atuais a diálise e a pervaporação encontram aplicações em rotinas analíticas que utilizam amostras com alta carga de matriz e processos contínuos de separação.

A pervaporação é uma técnica de separação promissora que integra evaporação e processo de difusão de gás num único passo. É de fácil execução em modo contínuo, permitindo assim uma grande simplificação e miniaturização de operações preliminares; de tal modo que a qualidade analítica e a produtividade possa ser claramente melhorada. Esta forma de separação não cromatográfica é referenciada como técnica limpa, uma vez que permite separação de compostos, principalmente orgânicos voláteis, sem a utilização de outros solventes ou processos térmicos (MATTOS & LUQUE, 1994); (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

O princípio da técnica se baseia na transferência dos analitos entre dois compartimentos separados entre si pelo uso de membrana, sendo que a separação depende da taxa de permeação do analito pela membrana (Fig. 6) que, é governada por diferencial de concentração (ΔC), pressão (ΔP) e potencial (ΔE) (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

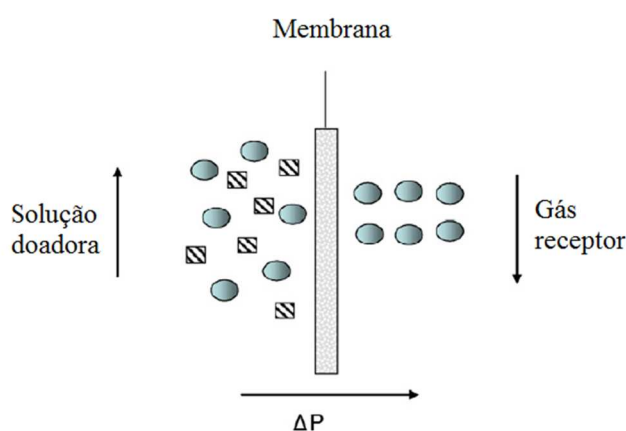


Figura 6. Ilustração de pervaporação

A pervaporação ocorre entre dois compartimentos, doador e receptor, contendo soluções ou gases, os compartimentos são separados entre si por uma membrana, a qual funciona como uma barreira seletiva, permitindo a transferência de massa entre os compartimentos de forma seletiva e sem contato entre a fase doadora e a membrana. Deste modo, moléculas no estado vapor e que possam transpassar a membrana migram de um compartimento ao outro. Ambos os compartimentos podem estar em fluxo contínuo de renovação de suas soluções, o que possibilita a automatização do processo e

interfaceamento com instrumentos para quantificação e análises em tempo-real (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010). Esta possibilidade faz da pervaporação uma técnica de separação não cromatográfica com grande potencial para tratamento de amostras em sistemas de análise em fluxo, tais como FIA e SIA.

A Pervaporação é única entre os processos envolvendo membranas que permite mudança de fase do analito ao longo da mesma. A separação ocorre em função da taxa de permeação do analito através da membrana e consiste, geralmente, das seguintes etapas (Fig. 7) (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010):

- (1) Difusão através da camada líquida no lado doador (C_{A1} para C_{A2});
- (2) Partição seletiva das moléculas para dentro da membrana (C_{A2} para C_{M1});
- (3) Difusão através da membrana sobre gradiente de concentração (C_{M1} para C_{M2});
- (4) Desorção para dentro da fase vapor no lado do acceptor (C_{M2} para C_{E1});
- (5) Difusão para longe da membrana através da camada limite do lado acceptor da membrana (C_{E1} para C_{E2}).

Onde, C_A , C_M e C_E são as concentrações do analito nas fases aquosa, membrana e extrativa, respectivamente.

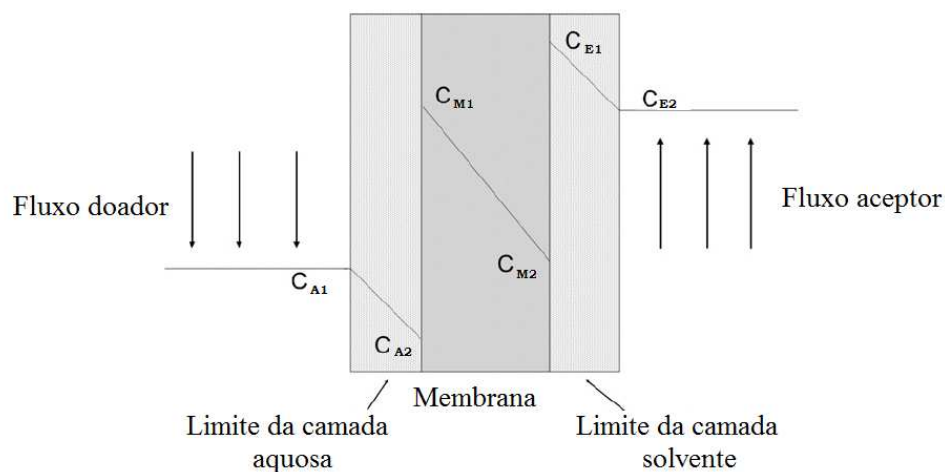


Figura 7. Perfil de processo extrativo em pervaporação

Estes mecanismos governam o transporte de massa através da membrana de pervaporação. A separação ocorre devido às diferenças do coeficiente de partição, difusibilidade e vaporização dos componentes da solução doadora. O fluxo (J) através

da membrana pode ser expresso em termos da diferença de pressão parcial através dos dois lados da membrana, doador e acceptor, de tal modo que:

$$J_a = P_{Ga} \times \frac{P_{ao} - P_{al}}{t} \quad (10)$$

Onde J_a é o fluxo para o componente a , t é a espessura da membrana, P_{Ga} é o coeficiente de permeabilidade de separação dos gases, P_{ao} é a pressão parcial do lado doador, e P_{al} a pressão parcial no lado acceptor para o componente a .

O potencial químico e/ou a diferença de pressão de vapor é, geralmente, mantida pela aplicação de vácuo no lado acceptor, ou por redução da pressão parcial por introdução de um gás de arraste.

Outro parâmetro importante é a seletividade, representada pelos termos fator de separação (α) e fator de enriquecimento (β). O fator de separação de uma membrana para as espécies a e b pode ser definido por:

$$\alpha_{ab} = \frac{C_a/C_b^V}{C_a/C_b^L} \quad (11)$$

O fator de enriquecimento é usado com um indicativo da seletividade de separação para o componente a :

$$\beta = \frac{C_a^V}{C_a^L} \quad (12)$$

Onde C_a e C_b são concentrações de a e b na fase de vapor (V) e fase líquida (L), respectivamente.

As variáveis de operação são críticas para o controle do processo de pervaporação. Por exemplo, uma alteração na concentração do doador afeta diretamente o fenômeno de adsorção na interface líquida da membrana e também as características ditadas pelos princípios de difusão em solução.

As pressões no lado doador e acceptor também são importantes. Operações de pervaporação são carregadas por aplicação de vácuo ou gás de arraste no lado acceptor, o que leva a uma diferença de potencial químico. Isto pode ser explicado pelo aumento na força motriz no lado direito da equação (BAADENHUIJESSEN & SEUREN-JACOBS, 1979). A temperatura afeta todas as etapas no processo de transporte do analito mencionadas anteriormente, e também altera a força motriz para a transferência de

massa. Relações estabelecidas com a equação de Arrhenius são utilizadas para descrever o efeito da temperatura no fluxo como segue:

$$J = J_0 e^{E_a/RT} \quad (13)$$

Onde J_0 é uma constante, E_a é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases, e T é a temperatura absoluta. Por outro lado, a seletividade é fortemente dependente da temperatura. Em muitos casos um pequeno aumento da seletividade é observado com redução da temperatura (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

Entre os fatores morfológicos, as membranas de pervaporação apresentam uma resistência na transferência de massa que é proporcional à espessura da membrana, conforme mencionado na equação (6) (BAADENHUIJESSEN & SEUREN-JACOBS, 1979).

Além disso, a espessura da membrana apenas pode ser aumentada até certo ponto, devido às limitações na fabricação e estabilidade mecânica, bem como a seletividade que é influenciada por esta. Considerando todos os outros fatores mencionados anteriormente, a camada limite, a qual é formada por uma camada fina de líquido na superfície, é de grande importância, pois ela pode ser o maior contribuinte para a resistência na transferência de massa a qual é menos significativa na camada da fase de vapor no fluxo de gás/vácuo no lado aceptor.

2.8.1 Classificação das membranas

A pervaporação é dependente de fatores envolvendo a membrana (Fig. 8), tais como morfologia, geometria e estrutura (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

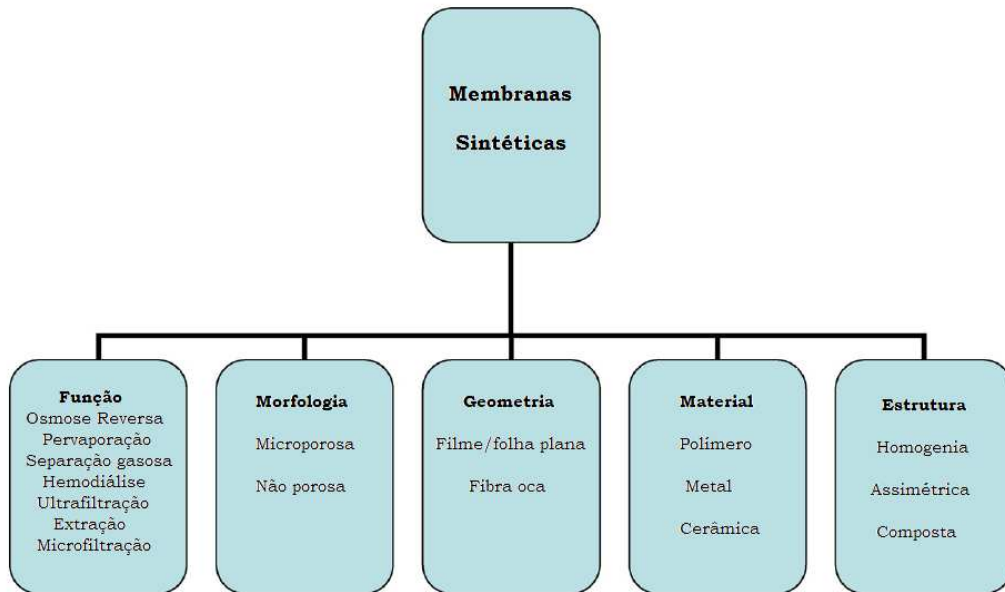


Figura 8. Classificação das membranas

2.8.1.1 Morfologia

As membranas de pervaporação podem ser classificadas como não porosas ou porosas. Tem sido demonstrado que as diferenças nos tamanhos de poros, forma, e distribuição afetam significativamente a eficiência e seletividade da pervaporação. Os mecanismos de transporte são fortemente dependentes do tipo de membrana. A pervaporação em membranas porosas ocorre, muitas vezes, por exclusão de tamanho.

Permeia pela membrana qualquer coisa que possa migrar através dos poros; por exemplo, em separação pervaporativa de compostos orgânicos na água, significativa quantidade de água permeia simultaneamente pela membrana. Como resultado, membranas porosas, em geral, promovem fluxo elevado, baixa seletividade e são excelentes para aplicações tais como nanofiltração e diálise.

Em membranas não porosas, a molécula necessita primeiramente participar de um processo de partição e então difundir sobre gradiente de concentração sobre o material sólido. Além disso, a separação por membranas não porosas são influenciadas por coeficiente de partição bem como difusibilidade dos componentes na membrana. Este tipo de membrana é mais utilizado em pervaporação e permite alta seletividade (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

A composição das membranas, geralmente, consiste de superfícies densas sobre uma camada microporosa (Fig. 9). A camada de revestimento que determina a

seletividade é de material diferente da camada suporte. Por exemplo, uma microcamada de silicone sobre uma camada suporte de polipropileno permite alto fluxo de compostos orgânicos voláteis durante a pervaporação de uma solução doadora aquosa, sem que haja passagem significativa de água para o lado aceptor.

Os desenvolvimentos recentes são as membranas de matrizes mistas (MMM), as quais consistem de matrizes polímeros interpenetráveis e enchimentos sólidos tais como zeólitos, peneiras moleculares de carbono, sílica, grafite, fulerenos, ciclodextrina, e óxidos metálicos. Processos típicos de fabricação de MMM envolvem adição de materiais suporte em soluções de polímeros, seguido de filmes de fundição. Nano materiais tais como nanotubos de carbono também são aplicados como filtros e membranas usadas em extrações e em pervaporação.

Na Fig. 9 é apresentada a MEV dos materiais (a) Membrana microporosa de polipropileno e (b) Membranas compostas (camada superficial de poliamida com suporte de polipropileno) (HYLTON & MITRA, 2007).

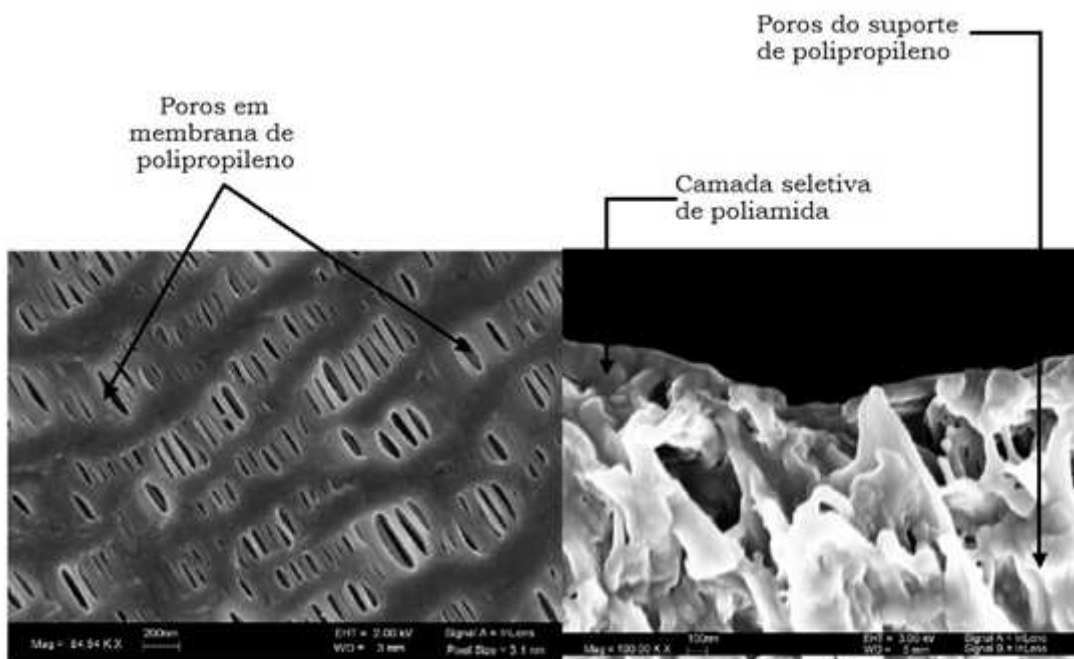


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de membranas

2.8.1.2 Geometria

A geometria da membrana se refere à forma desta. Os modelos mais comuns comercializados são as membranas planas, com geometria do tipo em folhas plana simples, folhas e suporte e/ou em espiral.

O modelo folha plana simples, pode dividir uma célula com uma única folha estando esta em contato simultâneo com o lado doador e aceptor, isto o torna um modelo ideal para módulos de pervaporação (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

Um pouco mais complexos são os modelos folha e suporte, em que as folhas planas encontram-se empilhadas umas sobre as outras intercaladas por um material de suporte; e o modelo em espiral, similar ao modelo folha e suporte, onde as folhas intercaladas com os suportes são enroladas em formato de cilindro. Neste modelo, o fluxo entra por uma das extremidades do cilindro e é descartado na outra extremidade, e o material permeável é coletado em um tubo posicionado no centro do cilindro (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

2.8.2 Pervaporação em sistemas de análises químicas em fluxo

Atualmente, sistemas FIA e SIA, são amplamente empregados via analisadores portáteis, semi-automáticos ou automáticos já comercializados. Em alguns casos estes sistemas são constituídos de módulos que realizam processos adicionais de tratamento de amostras, eliminam interferentes de matriz e preparam as mesmas para o aparelho de medição. Estes módulos garantem a automaticidade característica dos sistemas FIA e SIA, aumentando a sensibilidade e seletividade do método de análise. Mesmo para amostras brutas, estes módulos desempenham seu papel com eficiência, entretanto, para este tipo de amostragem, processos contínuos de separação cromatográfica se tornam inviáveis, dando espaço aos processos não cromatográficos tais como pervaporação, diálise e troca iônica (MATTOS & LUQUE, 1994).

Quando aplicada a sistemas SIA a pervaporação possibilita separar de forma direta ou indireta compostos da matriz. Na forma direta os analitos de interesse apresentam boa volatilidade na temperatura de trabalho e podem pervaporar facilmente através da membrana. Na forma indireta os analitos de interesse não apresentam volatilidade necessária para a pervaporação. Deste modo, utiliza-se dos recursos dos sistemas, ao que se refere a transporte de soluções e aplica-se condições para a ocorrência de uma reação no compartimento doador, de forma a produzir compostos voláteis que possam pervaporar (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010).

Em ambas as formas, direta e indireta, após a pervaporação os analitos podem seguir o fluxo diretamente para o detector ou passar por uma nova reação ao longo do sistema para garantir sua detecção, como por exemplo, reações de complexação com

reagentes colorimétricos, frequentemente utilizadas em identificações espectrofotométricas (WANG, CARDWELL, CATTRALL, CASTRO, & KOLEV, 2003); (PAIS, VIGIGAL, TOTH, & RANGEL, 2013). Entre os diversos métodos de análise com FIA e SIA constituídos de sistemas de pervaporação podem ser citados: Determinação de etanol em bebidas, diacetal em cerveja, acetaldeído em alimentos, formaldeídos em medicamentos e cosméticos, ácidos orgânicos em vinho, entre outros (SAE-KHOW & SOMENTAH, 2010); (PAIS, VIGIGAL, TOTH, & RANGEL, 2013).

Considerando os benéficos aspectos dos sistemas SIA e da pervaporação, o objetivo da presente dissertação é utilizar a estratégia de acoplar sistema SIA a módulo de pervaporação para determinar aminoácidos em hidrolisados de proteína.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método rápido, automático e de baixo custo, em análises da composição de aminoácidos em hidrolisados de proteína de soja, utilizando análise por injeção sequencial (SIA) com pervaporação e derivatização ninhidrina-aminoácidos, com monitoramento de CO₂ produzido na reação.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver método analítico para a quantificação de aminoácidos seguindo preceitos da química limpa;
- Desenvolver método analítico capaz de quantificar com precisão e exatidão concentrações de aminoácidos próximas às quantificáveis pelo método fotométrico de Moore e Stein (MOORE & STEIN, 1948), empregando a estratégia de medir o CO₂ liberado após a reação ninhidrina-aminoácidos;
- Reduzir o tempo da análise da composição de aminoácidos em proteínas, empregando a técnica de análise por injeção sequencial e forno de micro-ondas;
- Aplicar os princípios de pervaporação para separação e coleta de CO₂ produzido na reação ninhidrina-aminoácidos, visando método analítico com melhores limites de quantificação que os apresentados por métodos titrimétricos (SLYKE, MACFADYEN, & HAMILTON, 1941); (SMITH & AGIZA, 1951);
- Elaborar método analítico que permita a redução no consumo da amostra e dos reagentes;
- Validar metodologia analítica para análise da composição de aminoácidos em proteínas pela determinação de CO₂ liberado na reação ninhidrina-aminoácidos;
- Aplicar a metodologia desenvolvida e validada, em amostras reais de hidrolisados de proteína de soja, e comparar os resultados com os obtidos pelo tradicional método de Kjeldahl.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Reagentes

Água desionizada foi utilizada no sistema SIA e no preparo de todas as soluções.

Os padrões certificados de aminoácidos utilizados foram os L-enantiômeros de Alanina, Arginina, Asparagina, Ácido Aspártico, Cisteína, Cistina, Ácido Glutâmico, Glutamina, Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptofano, Tirosina, Valina, do Kit N° LAA-21 do fabricante Sigma-Aldrich.

Proteína concentrada de soja “SOLAE®” e ácido metanossulfônico 98,0% (Carlo Erba) foram utilizados para preparo do hidrolisado de proteínas de soja.

Citrato trissódico diidratado 99,5% (Merck) e Ácido cítrico anidro 99,5% (Synth) foram utilizados no preparo da solução tampão.

Ninhidrina para cromatografia (Carlo Erba), Etilenoglicol grau CG (Sigma Aldrich) e Cloreto estanhoso diidratado 99% (Carlo Erba) foram utilizados no preparo das soluções de ninhidrina.

Ácido Sulfúrico 98% (Synth) para preparo de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹.

Ácido Clorídrico 36-38% (Vetec) utilizado no preparo de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

4.2 Soluções

Tampão Citrato 0,2 mol L⁻¹: Mistura de 205,0 mL de ácido cítrico 0,2 mol L⁻¹ e 295,0 mL de citrato de sódio 0,2 mol L⁻¹. O pH do tampão foi verificado com auxílio de pHmetro, apresentando valor 5,0±0,1.

Solução de ninhidrina: Dissolvidos 500 mg do ninhidrina e 20 mg de cloreto estanhoso em 25 mL de etilenoglicol:tampão citrato 0,2 mol L⁻¹ (1:1 v/v) [56].

Solução Padrão de Aminoácido: Soluções individuais para cada um dos 20 aminoácidos foram preparadas por pesagem e dissolução inicial com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, seguida por diluição apropriada com tampão citrato 0,2 mol L⁻¹, atingindo-se concentração final de 5,0 mmol L⁻¹.

Solução Padrão Estoque de Aminoácidos: Preparada pela mistura volumétrica de cada uma das 20 soluções padrão de aminoácido, mantendo-se assim a concentração de 5,0 mmol L⁻¹ de aminoácidos total em solução e 0,25 mmol L⁻¹ para cada aminoácido.

Soluções de Trabalho Aminoácidos: Todas as soluções de trabalho utilizadas no processo de otimização e validação do método foram preparadas a partir da solução padrão estoque de aminoácidos, utilizando tampão citrato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como diluente.

Solução Amostra: A solução amostra refere-se ao hidrolisado de proteína de soja preparado segundo método proposto por CHIOU et al., com adaptações: Em tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca, com capacidade de 50 mL, foram pesados 10 mg da proteína concentrada de soja e adicionados 10 mL de ácido metanossulfônico 4 mol L^{-1} . Aplicou-se ao interior do tubo refluxo de gás nitrogênio durante 1 min, sendo vedado o tubo em seguida. A amostra foi aquecida a 160°C por 45 min através de banho de óleo e chapa de aquecimento. Após os 45 min, a amostra foi retirada do banho e aguardou-se o equilíbrio com a temperatura ambiente. Em seguida efetuou-se a diluição para 50 mL com solução citrato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O pH da amostra foi verificado com auxílio de pHmetro, apresentando valor de $5,0 \pm 0,5$.

4.3 Equipamentos

As análises foram realizadas empregando-se sistema de análise por injeção sequencial (SIA). O sistema SIA utilizado apresenta-se esquematizado na Fig. 10 e é constituído de Válvula rotatória (V) modelo Cheminert C2-2006D Vici Valco (Houston, USA); bomba de pistão (BP) composta de seringa de 1000 μL de capacidade da marca Kloehen (Las Vegas, USA); válvulas solenóides (VS) NReserch Incorporation modelo 161P011; bomba peristáltica da marca Milan modelo 204; condutivímetro marca YSI modelo 35; Multímetro marca Protek modelo 506, Forno de micro-onda Electrolux modelo ME28S, tensão 127/220 V, potência de saída 900 Watts, frequência 60 Hz; linhas de transmissão de polietileno e PTFE (0,8 mm de diâmetro interno) foram utilizadas no exterior e interior do micro-ondas, respectivamente. Os componentes foram controlados por microcomputador através de uma porta paralela.

Espectrofotômetro UV-Vis da marca Varian, modelo Cary 50, equipado com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, foi utilizado durante o estudo do melhor tempo de funcionamento do forno de micro-ondas para a ocorrência da reação.

Aparelho de Kjeldahl com destilador da marca Tecnal, modelo TE-036/1 e bloco digestor Químico, modelo Q-327A242 foi utilizado durante determinação da composição de aminoácidos em proteína concentrada de soja através do método de Kjeldahl.

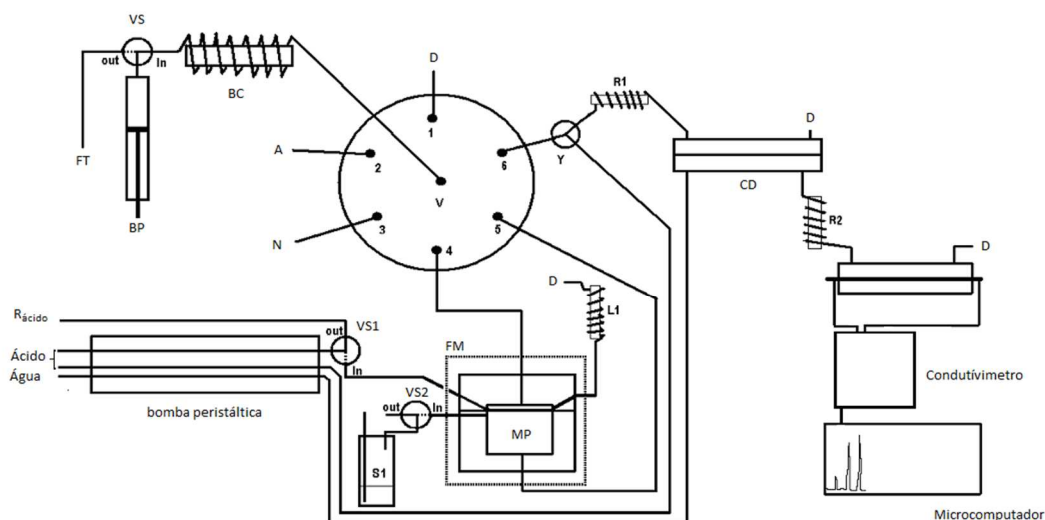


Figura 10. Sistema de análise por injeção sequencial

Na figura 10, as siglas correspondem a FT: fluxo transportador; V: válvula de seleção; BP: bomba de pistão; Y: confluência; BC: bobina coletora; A: amostra; D: descarte; Ácido: ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; R_{ácido}: reciclo do ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; CD: câmara de difusão; MP: módulo de pervaporação; L1: Coluna de Ácido; VS, VS1, VS2: válvula solenóide onde “in” e “out” abre e fecha o fluxo transportador, a câmara de pervaporação, recicla a solução acceptora respectivamente; R1 e R2: bobinas de reação; FM: forno de micro-ondas; S1: frasco lavador de gases.

A câmara de pervaporação foi construída em material politetrafluoretileno (PTFE) em formato cilíndrico (Fig. 13) e o compartimento da solução doadora (a) tem as dimensões de: 30 mm x 30 mm (externa); 15,7 mm x 9 mm (interna), resultando em capacidade de aproximadamente 1,0 mL de solução. O compartimento da solução receptora (b) possui dimensões de: 15 mm x 30 mm (externa) e 2 mm x 9 mm (interna).

A membrana utilizada na câmara de pervaporação foi de material PTFE com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ fabricada pela Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha).

A câmara de pervaporação foi mantida durante todas as análises na mesma posição, no centro da cavidade do forno de micro-ondas.

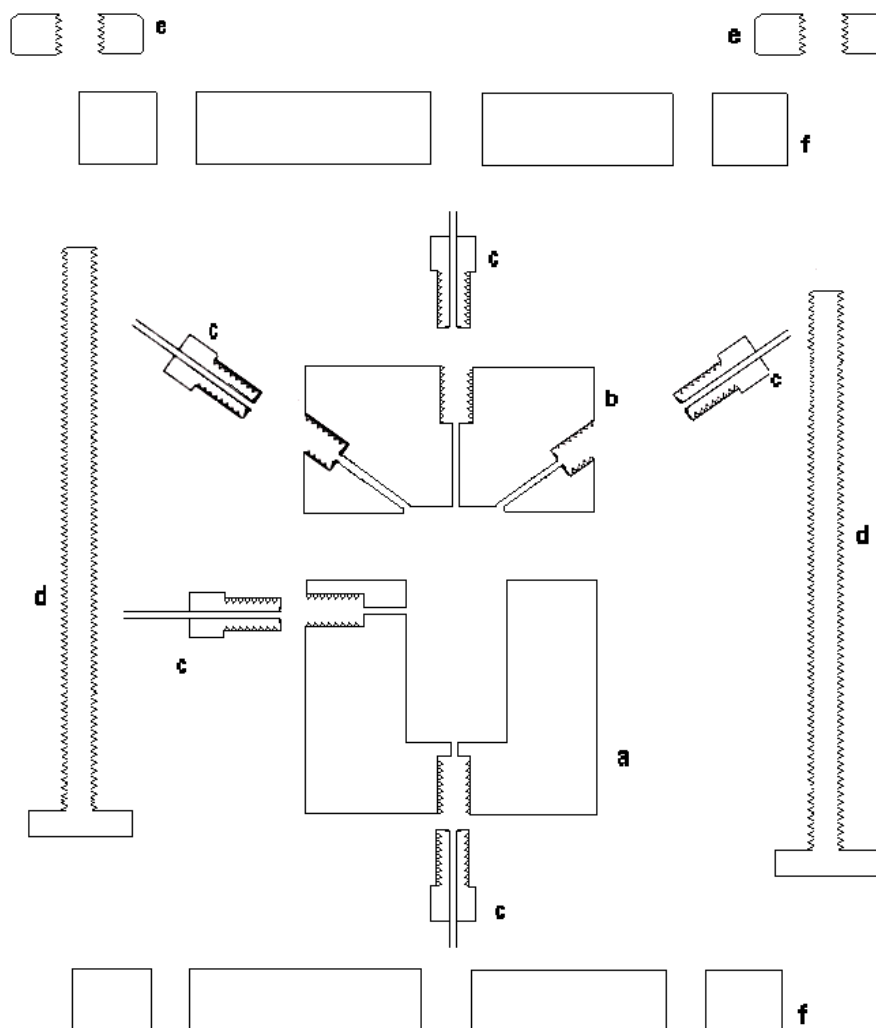


Figura 11. Esquema da câmara de pervaporação

Na figura 11 (a) corresponde ao compartimento da solução doadora, (b) ao compartimento da solução receptora, (c) aos conectores, (d) e (e) parafusos e porcas fixadores da câmara e (f) aos blocos de fixação da câmara.

A câmara de difusão foi construída em acrílico, sendo aplicada modificação em relação a trabalho anterior (BERTOZZI, 2013). Neste novo modelo a trajetória das soluções no interior da câmara foi projetada em formato espiral. A membrana utilizada foi de PTFE com diâmetro de poro de 0,45 μm fabricada pela Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha).

A cela de detecção condutométrica foi construída utilizando acrílico e chapas de aço inoxidável a partir de modificações de trabalhos anteriores (BERTOZZI, 2013) e contém 2 cm^2 de área de contato, espaçadas em 0,10 mm.

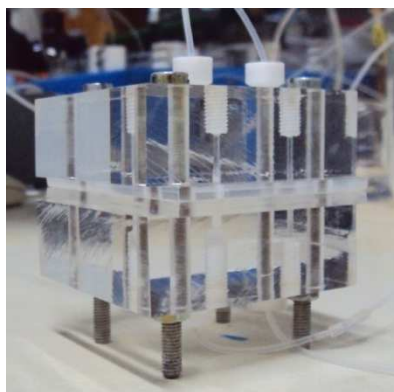


Figura 12. Imagem da câmara de difusão

4.3.1 Reação ninhidrina-aminoácido aplicada em SIA com pervaporação

Os testes iniciais para aplicação das técnicas de SIA e pervaporação ao processo de derivatização ninhidrina-aminoácido empregaram a princípio as mesmas concentrações e proporções do método convencional (MOORE & STEIN, 1948). Para atender a limitação volumétrica do reator, os volumes das soluções reagentes bombeadas ao compartimento da solução doadora foram reduzidos proporcionalmente para: 300 μL da solução de ninhidrina, 250 μL da solução de trabalho de aminoácidos 0,2 mmol L^{-1} e 125 μL de tampão citrato 0,2 mol L^{-1} . Após avaliação das respostas obtidas para concentrações de 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 e 5,0 mmol L^{-1} , optou-se pela utilização dos volumes de 300 μL da solução de ninhidrina, 300 μL de tampão citrato 0,2 mol L^{-1} e 100 μL da solução padrão estoque de aminoácidos (5,0 mmol L^{-1}) para a otimização instrumental e otimização química.

4.3.2 Otimização instrumental

O processo de automatização do método convencional pelo método proposto exigiu avaliação das etapas necessárias para a ocorrência da reação e determinação quantitativa dos aminoácidos.

O aquecimento da amostra, necessário para derivatização, foi realizado em forno de micro-ondas doméstico, substituindo banho-maria utilizado na literatura (MOORE & STEIN, 1948). Esta forma de aquecimento permite a automaticidade do método com redução do tempo de análise. A avaliação do melhor tempo de aquecimento para ocorrência da reação em forno micro-ondas foram realizadas nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 s de acionamento em potência máxima, 900 W.

As amostras injetadas no sistema SIA foram avaliadas utilizando o método de detecção fotométrico (espectrofotômetro UV-Vis, λ 570 nm) e condutométrico proposto, sendo que as amostras foram utilizadas simultaneamente para a quantificação por ambos os métodos de detecção. Para a análise espectrofotométrica as amostras foram coletadas durante a etapa de descarte após a reação; do coletado 200 μ L foram diluídos para 2,50 mL com etanol 60% (YOKOYAMA & HIRAMATSU, 2003), sendo realizada a leitura das amostras em duplicata.

Outro parâmetro avaliado remete ao efeito da vazão de injeção da solução receptora na confluência Y. A vazão da solução receptora é responsável pela pressão na câmara de difusão, cujo fenômeno de pervaporação é influenciado por esta propriedade físico-química. As vazões estudadas para o processo de injeção na confluência foram de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μ L s^{-1} . Para este parâmetro utilizou-se 120 s de tempo de acionamento do forno de micro-ondas.

Para ambos os testes de otimização da vazão cada taxa de fluxo foi avaliada em triplicata.

4.3.3 Otimização química

A otimização química teve como objetivo avaliar os efeitos de solvente, agente redutor e ninhidrina na produção de CO₂ resultante da reação de derivatização. Com objetivo de seguir os preceitos da química limpa foram realizados estudos para redução e/ou eliminação do uso de etilenoglicol (solvente), cloreto estanhoso (agente redutor) e ninhidrina (reagente) utilizados em métodos convencionais de derivatização ninhidrina-aminoácidos (STARCHER, 2001)[11,56]; (MOORE & STEIN, 1948).

Durante a otimização química foram utilizadas as condições de 120 s de acionamento do forno micro-ondas e 100 μ L/s de vazão durante injeção da solução receptora na confluência Y.

A avaliação do efeito do solvente foi testada em soluções de ninhidrina 20 mg/mL dissolvidas em soluções de etilenoglicol:tampão citrato 0,2 mol L⁻¹ nas proporções de 0:100, 25:75, 33:67, 40:60 e 50:50 v/v.

Para a avaliação do efeito do agente redutor na reação foram realizados testes com duas soluções de ninhidrina a 20 mg/mL, uma contendo cloreto estanhoso e outra sem o agente redutor. Uma terceira solução de ninhidrina foi preparada utilizando ácido ascórbico como agente redutor alternativo, segundo literatura (YOKOYAMA &

HIRAMATSU, 2003). A solução de ninhidrina com ácido ascórbico foi preparada dissolvendo-se 200 mg de ninhidrina e 60 mg de ácido ascórbico em 60 mL de etilenoglicol.

O consumo de ninhidrina pelo método proposto foi medido em ensaios com soluções de ninhidrina nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL em etilenoglicol:tampão citrato 0,2 mol L⁻¹ (50:50 v/v). Todas as soluções contendo cloreto estanhoso.

5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação da metodologia analítica foi realizada por avaliação dos parâmetros de Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Linearidade, Especificidade (Seletividade), Precisão (repetibilidade) e Exatidão.

5.1 Especificidade

O parâmetro de seletividade avalia a capacidade do método em quantificar o analito de interesse, em presença de outros compostos tais como impurezas, produtos de degradação e componentes de matriz ((ANVISA), 2003). Deste modo, a especificidade do método foi testada frente a amostras não contaminadas, e amostras contaminadas com anilina (composto que possui em sua estrutura um grupo amina, também reage com ninhidrina produzindo o composto RP) ou frutose (carboidrato utilizado para simular componente comum de matriz, reage com ninhidrina gerando complexos, e com aminoácidos segundo reação de Maillard). Estas classes de compostos são relatadas em literatura como interferentes em análises da composição de aminoácidos via método de derivatização com ninhidrina (FRIEDMAN, 2004); (AJANDOUZ, TCHIAKPE, ORE, BENAJIBA, & PUIGSERVER, 2001). As amostras “solução não contaminada” (solução de trabalho de aminoácidos 1,0 mmol L⁻¹), “solução de AAs+fenilamina” (solução de trabalho de aminoácidos 1,0 mmol L⁻¹ + fenilamina 1,0 mmol L⁻¹) e “solução de AAs+frutose” (solução de trabalho de aminoácidos 1,0 mmol L⁻¹ + frutose 2,0 mol L⁻¹) foram analisadas em triplicata. O coeficiente de variação (CV) das leituras foi empregado para verificação da seletividade do método.

5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito na amostra. Sendo recomendada sua determinação em, no mínimo, 5 concentrações diferentes ((ANVISA), 2003). As soluções utilizadas na determinação da linearidade foram preparadas a partir da solução estoque de aminoácidos, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mmol L⁻¹.

5.3 Precisão

A precisão no nível de repetibilidade foi testada pela avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma solução amostras de hidrolisado de proteína de soja, com preparo conforme descrito no item “Soluções”. Sendo realizadas 6 (seis) determinações da solução amostra. A precisão do método foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (dpr), segundo a equação abaixo.

$$\text{DPR} = \frac{\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}}{\bar{x}} \times 100 \quad (14)$$

Em que:

x_i é a sinal analítico obtido na análise da “i” amostra;

\bar{x} é a média dos sinais analíticos obtidos nas análises das amostras “ x_1, x_2, \dots, x_i ”;

n é o número de avaliações.

5.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção ou limite ótimo de detecção (LOD), menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, foi estimado com os sinais analíticos obtidos em 6 determinações de amostra branco, aplicando os dados de desvio padrão (σ) das determinações e inclinação de curva de calibração (S) a equação do LOD ((ANVISA), 2003); (Acreditação, 2010).

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{S} \quad (15)$$

O limite de quantificação ou limite ótimo de quantificação (LOQ), menor quantidade de analito presente em amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, foi estimado com os sinais analíticos obtidos em 6 determinações de amostra branco, aplicando os dados de desvio padrão (σ) das determinações e inclinação de curva de calibração (S) a equação do LOD ((ANVISA), 2003); (Acreditação, 2010).

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad (16)$$

5.5 Exatidão

A exatidão do método SIA com pervaporação foi testada pela avaliação da recuperação de aminoácidos em hidrolisado de proteína concentrada de soja, sendo os resultados comparados com o método de Kjeldahl, recomendado pela A.O.C.S. (American Oil Chemists Society) (FIRESTONE, 2006) e aceito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em análises de proteína total em alimentos.

$$\text{recuperação(\%)} = \frac{\text{Teor de AAs por método SIA}}{\text{Teor de AAs por método de Kjeldahl}} \times 100 \quad (17)$$

5.6 Procedimento

Durante as análises os comandos executados pelo SIA são os apresentados na tabela abaixo. Os comandos foram transmitidos ao sistema por software desenvolvido em linguagem Basic, compilado em QuickBasic e utilizando MS-DOS como sistema operacional. O interfaceamento foi efetuado por placa controladora construída em estudos anteriores (BERTOZZI, 2013).

Tabela 4. Eventos executadas pelo sistema SIA.

Etapas	Linha de Comando	Descrição da ação
01	LP 3	Válvula VS1 aberta;
02	LP 1 ^(a)	Válvula VS aberta;
03	S ^(b) 600 ^(c) 100 a	Aspira 600 µL da solução tampão (FT) na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
04	V3	Posição 3 da válvula de seleção é habilitada;
05	S 300 50 a	Aspira 300 µL da solução de Ninhidrina na vazão de 50 µL s ⁻¹ ;
06	V2	Posição 2 da válvula de seleção é habilitada;
07	S 100 100 a	Aspira 100 µL da solução de trabalho na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
08	LP 5	Válvula VS2 aberta;
09	V5	Posição 5 da válvula de seleção é habilitada;
10	S 1000 100 i	Injeta 1000 µL da mistura na V5 na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
11	V1	Posição 1 da válvula de seleção é habilitada;
12	LP 4	Forno de micro-ondas é acionado;
13	ts 120	Tempo de funcionamento do forno de micro-ondas de 120 segundos;
14	DP 4	Desliga o forno de micro-ondas;
15	LP 1	Válvula VS aberta;
16	S 200 100 a	Aspira 200 µL do tampão na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
17	V5	Posição 5 da válvula de seleção é habilitada;
18	S 200 100 i	Injeta 200 µL do tampão na V5 na vazão de 100 µL s ^{-1(d)} ;
19	ts 10	Aguarda de 10 segundos para estabilização do gás;
20	V4	Posição 4 da válvula de seleção é habilitada;
21	S 1000 100 a	Aspira 1000 µL da solução receptora na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
22	ts 5	Aguarda de 5 segundos para estabilização do gás na BC;
23	LP 2 3 5	Fluxo da bomba peristáltica é reduzido de 3,0 mL para 1,5 mL min ⁻¹ ; Válvulas VS1 e VS2 são acionadas;
24	V6	Posição 6 da válvula de seleção é habilitada;
25	S 1000 100 i	Injeta 1000 µL da solução receptora na confluência Y na vazão de 100 µL s ⁻¹ ;
26	V5	Posição 5 da válvula de seleção é habilitada;

27	S 1000 100 a	Aspira 1000 μL da solução doadora na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
28	V1	Posição 1 da válvula de seleção é habilitada (1° descarte);
29	S 1000 100 i	Injeta 1000 μL da solução doadora na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
30	DP 2	Fluxo da bomba peristáltica é retomado para $3,0 \text{ mL min}^{-1}$;
31	V5	Posição 5 da válvula de seleção é habilitada;
32	S 1000 100 a	Aspira 1000 μL na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$ para total esvaziamento do compartimento da solução doadora e linha de transmissão;
33	V1	Posição 1 da válvula de seleção é habilitada (2° descarte);
34	S 1000 100 i	Injeta 1000 μL do descarte na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
35	LP 1	Válvula VS e acionada;
36	S 1000 100 a	Aspira 1000 μL da solução tampão na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
37	V5	Posição 5 da válvula de seleção é habilitada;
38	S 1000 100 i	Injeta 1000 μL do tampão (lavagem) na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
39	S 1000 100 a	Aspira 1000 μL do tampão (lavagem) na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;
40	V1	Posição 1 da válvula de seleção (descarte) é habilitada;
41	S 1000 100 i	Injeta 1000 μL do tampão (lavagem) na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$;

^(a)Os comandos com recuo à direita foram executados sobre permanência da ação do primeiro comando anterior sem recuo. ^(b)Seringa. ^(c)300 μL dos quais correspondem ao volume morto da linha de transmissão. ^(d)A injeção de 200 μL do tampão resulta no total de 900 μL de solução enviados ao compartimento da solução doadora, forçando a passagem dos gases produzidos na reação através da membrana até a solução receptora.

A bomba peristáltica corresponde ao único componente do sistema que permanece em funcionamento constante durante a execução de todas as etapas e intervalos entre leituras. Ela é responsável pelo reciclo da solução receptora (ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e passagem contínua de água desionizada pela cela condutométrica, mantendo a estabilidade da linha de base.

A etapa 25 corresponde à injeção da solução receptora contendo dióxido de carbono liberado na reação. No entanto, o sinal analítico começa a ser obtido logo após a execução da etapa 30. A variação de tempo entre a injeção e a detecção é necessária e ocorre devido à redução de vazão da bomba peristáltica. A redução da vazão é indispensável para evitar o aumento da pressão nas linhas de transmissão durante a injeção da solução receptora na confluência Y. Além disto, o fluxo reduzido permite que a solução receptora passe mais lentamente pela câmara de difusão, favorecendo a passagem de CO_2 pela membrana de PTFE.

Para que o analito comece a chegar à cela de detecção somente após toda a solução receptora ter passado pela câmara de difusão, a linha de transmissão entre a câmara de difusão e a cela de detecção apresenta uma bobina em material polietileno. A etapa 30, correspondente ao aumento da vazão da bomba peristáltica, é realizada exatamente após toda a solução receptora ter passado pela câmara de difusão. O CO_2 difundido através da membrana e dissolvido em água permanece na bobina de polietileno até o aumento da vazão, este aumento de fluxo provoca uma passagem rápida do analito pela cela de detecção, evitando alargamento do sinal. O sinal da condutividade elétrica gerado durante a passagem do eletrólito na cela de detecção é registrado pelo condutivímetro e convertido em tensão elétrica ou diferença de potencial (DDP), sendo transmitido por saída analógica ao multímetro que, faz o registro do sinal em milivolts (mV) e então transmite ao microcomputador via porta paralela, sendo registrado pelo software Protek 506, fornecido pelo fabricante do aparelho.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises iniciais visando a adaptação do método clássico de determinação de aminoácidos por derivatização com ninhidrina ao método automatizado indicaram respostas positivas já nos primeiros testes. Respeitando-se o volume do reservatório da solução doadora, os testes realizados em sistema SIA com pervaporação, seguindo as mesmas concentrações e proporções das empregadas pelo método clássico (Ninhidrina

20 mg mL⁻¹ : AAs 0,2 mmol L⁻¹ : Tampão 0,2 mol L⁻¹ 12:10:5 v/v/v), permitiram a confirmação da geração dos produtos RP e CO₂.

O produto RP pôde ser confirmado inicialmente de forma visual durante etapa de descarte da solução doadora que, após reação apresentou coloração púrpura, característica do composto. Posteriormente, foram efetuadas coletas desta solução que era descartada e foi realizado espectro de absorção molecular na região UV-Vis. Os máximos e mínimos de absorção na faixa de 200-800 nm coincidiram com os apresentados na literatura, ocorrendo absorção máxima em λ 570 nm (FRIEDMAN, 2004).

O CO₂ também apresentou indicativos visuais de sua produção durante a reação com ninhidrina e injeção da solução receptora na confluência Y, a grande quantidade de bolhas na tubulação de PTFE indicou a presença do gás. O sinal analítico obtido na cela de detecção, após a etapa de difusão, confirmou a presença de eletrólito na água desionizada. Durante análises do branco nenhum dos indicativos visuais foram observados. Um sinal analítico de baixa intensidade, aproximadamente 30 mV, foi registrado pela cela de detecção para a análise do branco. Durante investigações verificou-se que este sinal era resultante da perturbação do equilíbrio da vazão do sistema provocada pelo retorno da vazão normal, após esta permanecer por um intervalo de tempo definido em vazão reduzida (etapas 23-30 do processo).

Os aldeídos, produzidos durante a reação ninhidrina-aminoácidos, não foram detectados. A instabilidade desta classe de compostos e suas reações paralelas com ninhidrina (FRIEDMAN, 2004) dificultaram o processo de coleta destas substâncias no compartimento da solução receptora. Um teste com o aminoácido alanina, precursor do aldeído etanal, foi realizado no sistema utilizando o reagente dimetilsulfóxido como solução receptora, posterior à etapa de coleta da solução receptora foi realizada etapa de extração do aldeído com dietil éter e injeção das amostras em sistema cromatográfico de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-MS) e acoplado a detector de captura eletrônica (CG-DCE), não sendo detectada a presença de etanal nas amostras por nenhum dos detectores. Entretanto, estes resultados preliminares não eliminam a possibilidade de quantificação de aminoácidos por meio destes produtos. Metodologias envolvendo cromatografia em fase gasosa para determinação de aminoácidos por quantificação de seus respectivos aldeídos produzidos são técnicas já conhecidas (ZLATKIS, ORÓ, & KIMBALL, 1960).

Complementando os testes de adaptação do método, foram realizadas avaliações de sinal analítico em função da concentração da solução de AAs na faixa de 0,2 a 5,0 mmol L⁻¹, com volume fixo de injeção de 100 µL destas soluções. A análise teve como objetivo estimar a melhor concentração e sinal analítico para realização dos testes de otimização química e instrumental. Como resultado obteve-se um melhor sinal analítico com a injeção de 100 µL da solução estoque de AAs 5,0 mmol L⁻¹, 300 µL da solução de ninhidrina e 300 µL de tampão citrato 0,2 mol L⁻¹. Deste modo, estas foram as concentrações e volumes empregados durante a otimização do método.

Como o método de detecção registra sinais transientes, possíveis oscilações na linha de base, comuns em longos períodos de determinação, foram consideradas em correções da intensidade do sinal analítico. Assim, a intensidade do sinal analítico foi considerada como o resultado da subtração entre máxima intensidade do sinal registrado e o sinal da linha de base anterior à saída do pico em todas as análises.

6.1 Otimização instrumental

Os resultados dos estudos referentes ao tempo de acionamento do forno de micro-ondas e da vazão de injeção da solução receptora na confluência Y são apresentados em forma de gráfico de barras, com os respectivos desvios padrões das leituras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.1.1 Vazão durante injeção da solução receptora na confluência Y

A alteração na câmara de difusão em relação a estudo anterior realizado com o mesmo sistema SIA (BERTOZZI, 2013), tornou necessária uma nova avaliação da vazão durante injeção da solução receptora na confluência Y. Vazões muito altas podem gerar sinais analíticos baixos devido à rápida passagem da solução receptora, contendo o CO₂ pela câmara de difusão. Vazões muito baixas podem provocar alargamento do sinal analítico por efeito de dispersão ao longo da linha de transmissão entre a câmara de difusão e a cela de detecção, reduzindo a intensidade do sinal analítico.

A Fig. 13 apresenta os resultados dos sinais analíticos obtidos durante o estudo da vazão de injeção da solução receptora na confluência Y, a faixa de vazão avaliada compreende de 30 a 100 µL s⁻¹. A faixa de 60 e 100 µL s⁻¹ apresentou os melhores resultados, sendo que o menor desvio padrão foi observado para a vazão de 100 µL s⁻¹.

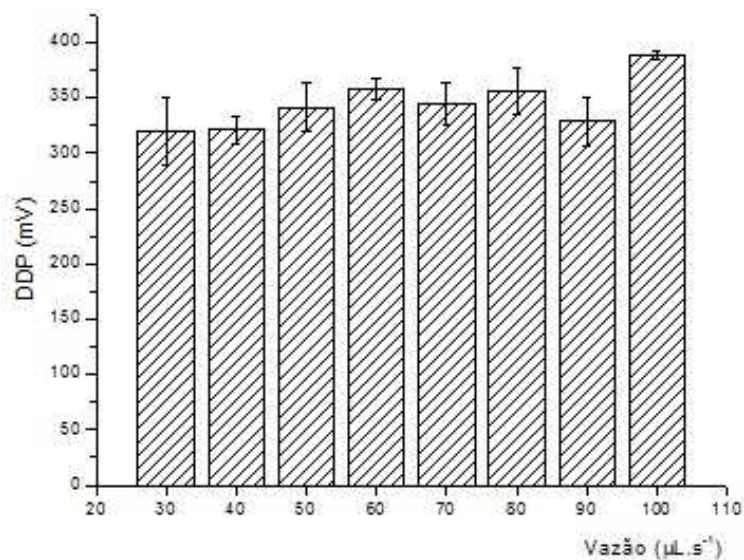


Figura 13. Estudo da vazão durante injeção na confluência Y

6.1.2 Tempo de acionamento do forno de micro-ondas

As amostras injetadas no sistema para o estudo do tempo de acionamento do forno de micro-ondas nos intervalos de tempo de 30, 60, 90, 120 e 150 s, e avaliadas utilizando os métodos de detecção fotométrica (absorbância em λ 570 nm pelo composto RP) e condutométrico (proposto), apresentaram o mesmo perfil de formação para os produtos RP e CO₂; demonstrando que as etapas de pervaporação, difusão e detecção constituintes do sistema SIA foram executadas com êxito e o sinal responde de forma proporcional às mudanças de concentração de CO₂ produzido na reação.

Da faixa de intervalo de tempo testado, 120 s demonstrou ser satisfatório para realizar as análises, pois para esta condição obteve-se bom sinal analítico e baixo valor de desvio padrão entre as leituras em ambos os métodos de detecção. Na figura abaixo (a) corresponde a detecção condutométrica, e (b) detecção fotométrica (λ 570 nm).

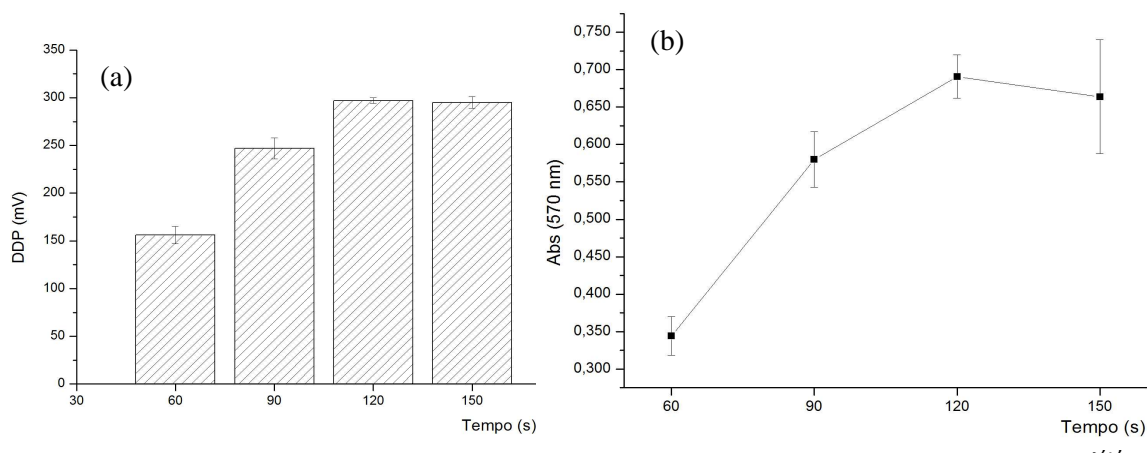


Figura 14. Estudo do tempo de acionamento do forno de micro-ondas

6.2 Otimização Química

6.2.1 Efeito do agente redutor

A solução de ninhidrina preparada contendo ácido ascórbico como agente redutor apresentou para o branco sinal analítico de $145,33 \pm 23,79$ mV. A degradação do ácido ascórbico à temperatura de 190-192°C pode ser a causa dos altos sinais obtidos para o branco. Ainda, dados literários apresentam resultados de potencialização da degradação de ácido ascórbico pela ação de micro-ondas (VIKRAM, RAMESH, & PRAPULLA, 2005). Assim, o uso de ácido ascórbico para o método proposto demonstrou-se inadequado, não sendo aplicado o uso do reagente em testes posteriores.

Os sinais analíticos obtidos para as leituras do branco e dos padrões nas análises realizadas com solução de ninhidrina sem agente redutor e com cloreto estanhoso são apresentados na Fig. 15. Os resultados demonstram a viabilidade de quantificação dos aminoácidos pelo método proposto sem a utilização de nenhum agente redutor; seguindo assim, um dos princípios da química verde: a redução ou não utilização de reagentes tóxicos ou nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (ANASTAS & WARNER, 1998).

A adição de um agente redutor à solução de ninhidrina tem por finalidade estabelecer um equilíbrio entre as formas hidratada e reduzida da ninhidrina (hidrindantina) (MOORE & STEIN, 1948). A molécula de hidrindantina e a amônia proveniente do aminoácido são as precursoras do composto RP, gerado pela condensação destas moléculas. Esta etapa da reação ocorre somente após a descarboxilação, etapa irreversível do processo (FRIEDMAN, 2004). Assim, o uso de agente redutor para o método proposto não apresenta finalidade, uma vez que a quantificação é realizada pela análise de CO₂ liberado na reação. No entanto, mesmo sem esta necessidade aparente, a retirada do agente redutor poderia resultar em alteração no equilíbrio da reação. Deste modo, o efeito do agente redutor para o método proposto foi avaliado.

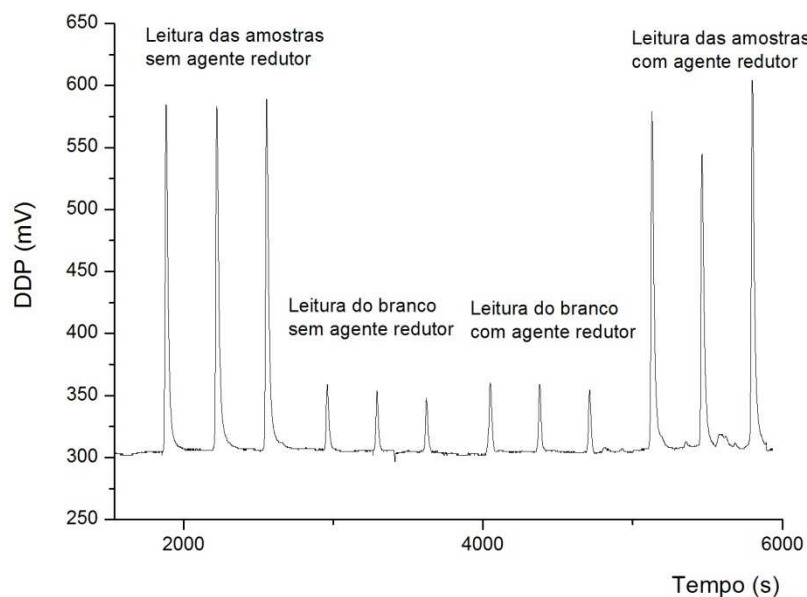


Figura 15. Efeito do agente redutor no sinal analítico

6.2.2 Avaliação do efeito do solvente e concentração de ninhidrina

A avaliação do efeito do solvente etilenoglicol, realizada por alteração de sua proporção na solução de ninhidrina e conseqüentemente na mistura reacional, gerou resultados que demonstram sua importância para a ocorrência da reação. Apresentados na literatura como agentes estabilizantes para a reação de derivatização ninhidrina-aminoácido (STARCHER, 2001), solventes tais como etilenoglicol, dimetilsulfóxido e Metil Cellosolve[®] elevam o ponto de ebulição da mistura durante a etapa de aquecimento e aumentam a solubilidade de ninhidrina e hidrindantina no meio reacional. A reação de derivatização ocorre em temperaturas superiores a 100°C, sendo esta praticamente instantânea a 140°C [29]; desta forma etilenoglicol age como aditivo para o meio aquoso, permitindo que a amostra atinja temperaturas elevadas sem que ocorra ebulição tumultuosa.

Entre as proporções avaliadas, etilenoglicol:tampão citrato 0,2 mol L⁻¹ 0:100 v/v resultou em sinais analíticos próximos aos obtidos para o branco, demonstrando a necessidade do solvente etilenoglicol para a ocorrência da reação. A proporção 25:75 v/v resultou em decréscimo do sinal analítico e ebulição fervorosa da mistura durante a etapa de aquecimento, evidenciada pela presença do composto RP na solução receptora. Para as proporções 33:67; 40:60 e 50:50 v/v nenhuma variação significativa do sinal analítico pode ser observada.

Os ensaios envolvendo variações de concentração das soluções de ninhidrina (10, 15, 20, 25 e 30 mg mL⁻¹) apresentaram resultados que confirmam como melhor condição de análise a concentração de 20 mg mL⁻¹ de ninhidrina, conforme descrito em literatura (MOORE & STEIN, 1948).

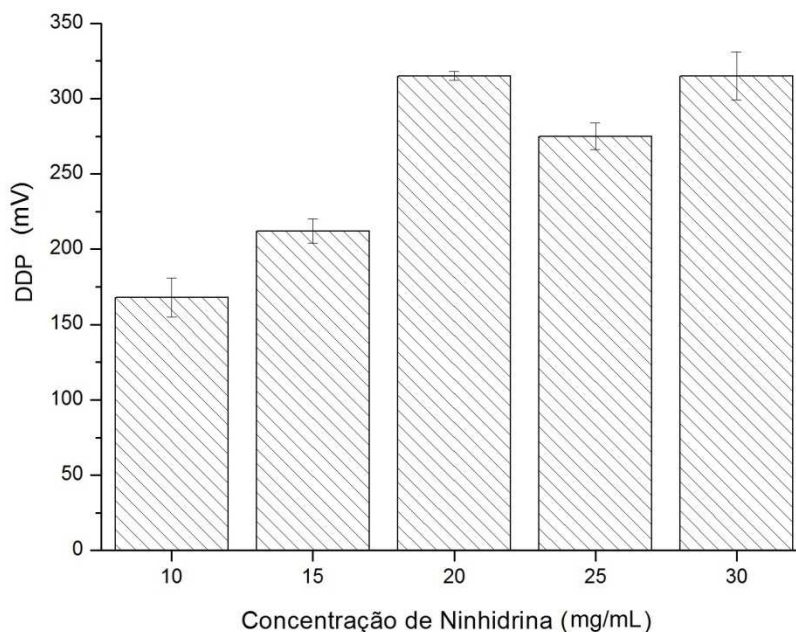


Figura 16. Efeito da concentração de ninhidrina no sinal analítico

6.3 Validação do método

A validação do método de quantificação de aminoácidos utilizando sistema SIA com pervaporação foi realizada considerando os resultados obtidos na otimização química e instrumental. Para as condições químicas eliminou-se o uso do agente redutor cloreto estanhoso, mantendo-se a concentração de 20 mg mL⁻¹ para solução de ninhidrina solubilizada em etilenoglicol : tampão citrato 0,2 mol L⁻¹ 50:50 v/v conforme método convencional (MOORE & STEIN, 1948). As condições instrumentais utilizadas foram: vazão durante injeção da solução receptora na confluência Y de 100 µL s⁻¹ e tempo de acionamento de forno micro-ondas de 120 s. A frequência analítica pode ser determinada durante a validação, resultando em taxa de 12 amostras h⁻¹.

6.3.1 Especificidade

Os compostos utilizados como interferentes frutose e anilina, representam os carboidratos e aminas que segundo literatura (FRIEDMAN, 2004) dificultam a

quantificação dos aminoácidos através dos métodos de Kjeldahl e fotométrico. A avaliação da seletividade do método proposto frente a amostras de aminoácidos e amostras de aminoácidos contaminadas com carboidrato e amina resultou em dpr de 3,01%. As amostras de carboidrato e amina sem adição de aminoácidos apresentaram sinal analítico similar ao do branco, comprovando a seletividade do método para o fim a que ele se propõe.

O baixo efeito de interferência para as amostras contaminadas se deve à escolha do produto de reação monitorado, CO₂. Em análises fotométricas, onde é monitorado o produto RP, aminas causam interferência porque também produzem o mesmo composto RP ao reagir com ninhidrina (FRIEDMAN, 2004); (HARDING V. J., 1916). Entretanto para esta classe de compostos o mecanismo de reação não apresenta etapa de descarboxilação, conforme ocorre para os aminoácidos, logo não há formação de CO₂. A interferência causada por carboidratos se deve a formação de complexos que absorvem no comprimento de onda utilizado na detecção (λ 570 nm) (FRIEDMAN, 2004).

Para o método de Kjeldahl, os interferentes correspondem a qualquer composto que contenha nitrogênio, uma vez que o método utiliza decomposição de amostras e evolução de amônia (American Association of Cereal Chemists, 1995). Para as condições estabelecidas no presente método, a única fonte de CO₂ é a reação de derivatização de ninhidrina-aminoácidos, visto que não há processos de decomposição da amostra nem a formação deste produto por reações paralelas de ninhidrina com componentes de matriz ou interferentes. Assim, os interferentes tradicionais citados em literatura (aminas e carboidratos) não provocaram alteração no sinal analítico para o método proposto.

6.3.2 Linearidade

A linearidade avaliada para 5 concentrações de aminoácidos na faixa de 0,5 a 3,5 mmol L⁻¹ apresentou equação da reta $y = 82,4713x + 125,8851$, coeficiente de correlação linear r^2 0,9912 e valor de F 1460,9693.

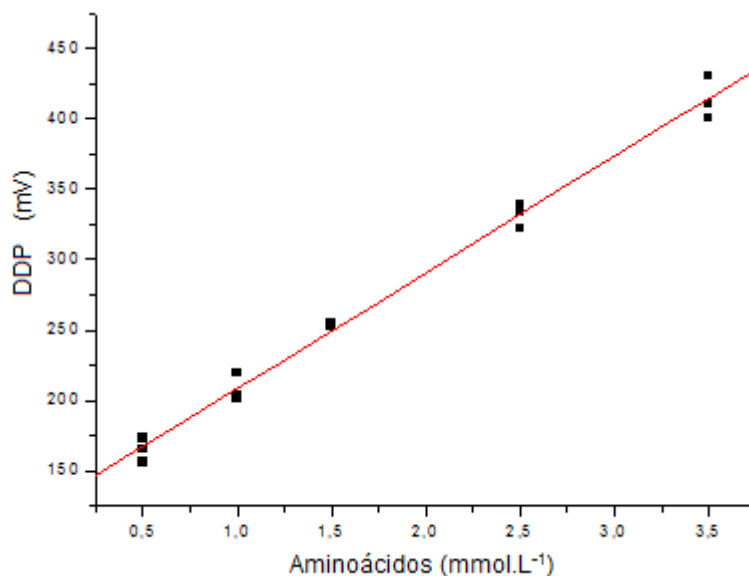


Figura 17 - Análise de linearidade para 5 níveis de concentração de AAs na faixa de 0,5 a 3,5 mmol L⁻¹

A verificação da linearidade foi realizada pela análise do r^2 e do valor de F. O r^2 representa o quanto a reta pode ser considerada como o modelo matemático do gráfico em questão, sendo o valor mínimo aceitável $r^2 \geq 0,99$ ((ANVISA), 2003). O valor de F indica a significância da regressão linear, onde é usado para testar a hipótese nula de que a variância total em y é igual à variância decorrente do erro, de maneira que a regressão é significativa quando o valor de F for grande (SKOOG, HOLLER, & WEST, 2006). Com um nível de confiança de 95% o valor F tabelado é 3,48 (BARBETTA, 2010). Os valores de r^2 e F obtidos cumprem com as especificações, de modo que a regressão é significativa e a faixa de concentração é linear.

A faixa de linearidade do método proposto permite quantificar concentrações de aminoácidos em solução entre 0,5 e 3,5 mmol L⁻¹, o que corresponde a 65,9 e 461,1 mg L⁻¹ em amostras hidrolisadas de proteína de soja. Esta faixa de concentração possui limite próximo ao determinável pelo método fotométrico, 0,2 mmol L⁻¹, sendo que um aumento da capacidade volumétrica do compartimento da solução doadora poderia favorecer a formação de CO₂ e permitir limites de quantificação inferiores aos 0,35 mmol L⁻¹ obtidos com o volume utilizado.

6.3.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação calculados foram estimados com base nos resultados obtidos em leituras consecutivas de amostras “branco”. As 6 determinações de branco produziram os seguintes sinais analíticos: 45, 43, 42, 37, 45 e 45 mV, resultando em dpr de 2,85. Deste modo, o método possibilita detectar e quantificar amostras em concentrações de 0,10 e 0,35 mmol L⁻¹, respectivamente.

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{S} = \frac{3 \times 2,85}{82,47} = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S} = \frac{10 \times 2,85}{82,47} = 0,35 \text{ mmol L}^{-1}$$

6.3.4 Precisão Repetibilidade

A repetibilidade de seis determinações da solução amostra de hidrolisado de proteína de soja resultou em dpr de 4,83, atendendo aos critérios de precisão descritos em normativas de validação de métodos analíticos ((ANVISA), 2003); (Acreditação, 2010), onde o valor aceitável corresponde a $\text{dpr} \leq 5,0$.

A figura abaixo apresenta as leituras realizadas durante a análise dos parâmetros de Precisão, LOD e LOQ.

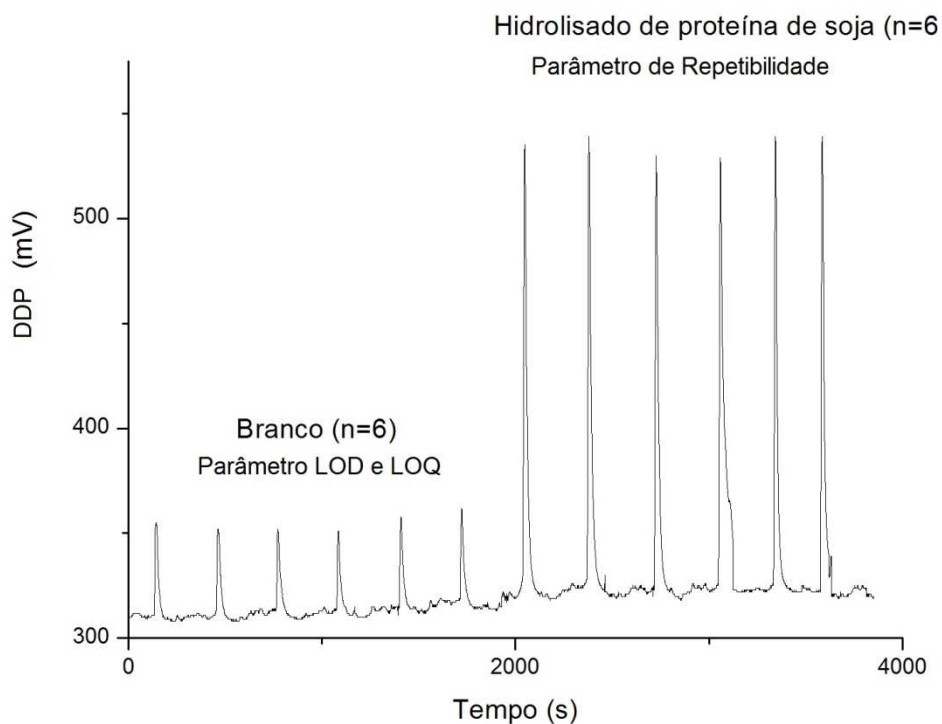


Figura 18. Análise de LOD, LOQ e Precisão repetibilidade

6.3.5 Exatidão

O método desenvolvido foi aplicado à quantificação de aminoácidos e determinação do teor de proteína em amostras de hidrolisado de proteína concentrada de soja. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos através do método oficial de Kjeldahl instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como método para a determinação do teor de proteínas em farelo de soja (FIRESTONE, 2006).

A análise da exatidão pelo método proposto envolveu a avaliação das amostras frente curva de calibração. Cada nível de concentração da curva foi analisado em triplicata, e as amostras em duplicata.

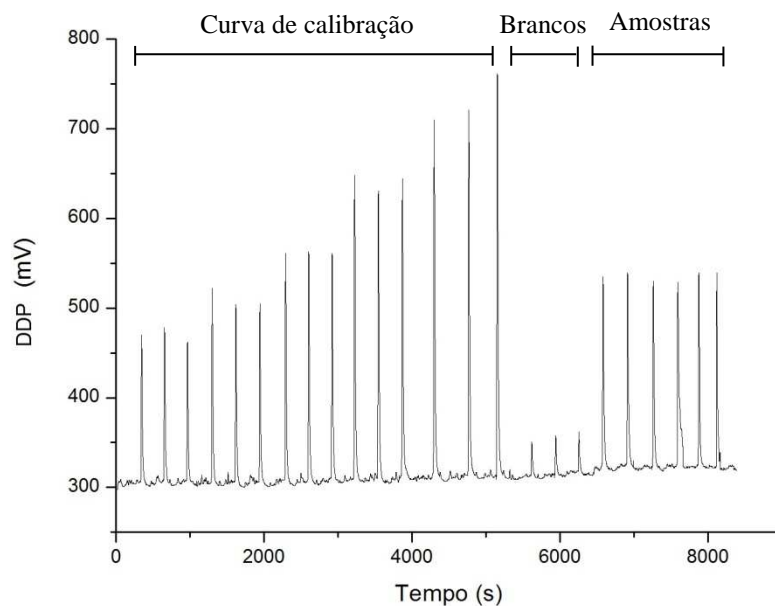


Figura 19. Análise de exatidão pelo método SIA - Pervaporação

Os valores para a composição de aminoácidos por determinação via método de Kjeldahl foram obtidos aplicando-se os dados da normalidade do ácido clorídrico, fator de padronização do ácido, volume (mL) da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra e massa (mg) de amostra da proteína concentrada de soja. Os dados foram aplicados a equação convencional para determinação de nitrogênio de proteína via método de Kjeldahl. Após a estimativa do N(%) na amostra, aplicou-se o fator de conversão nitrogênio de proteína (N:P) para determinação do teor de proteína na amostra bruta.

Quadro 1. Determinação de N(%) na amostra por método de Kjeldahl

Amostra	m_a (mg)	V (mL)	f	N	$N(\%)$	$N(\%)$ médio	DPR(%)
1	200,1	32,3			11,24		
2	204,2	34,8	0,9951	0,05	11,87	11,65	2,47
3	209,7	35,6			11,83		

$$N(\%) = \frac{V \times N \times f \times 14}{m_a}$$

O Racional da equação presente no Quadro 1 é descrito em “Revisão bibliográfica > Determinação do conteúdo de proteína por método de Kjeldahl”.

O fator de conversão (N:P) convencional assume que 16% da massa da proteína corresponde a nitrogênio. Assim, os dados obtidos de N(%) na análise pelo método de Kjeldahl demonstram que a amostra possui segundo média das três (3) determinações: 11,65 nitrogênio percentual. Deste modo, a estimativa do conteúdo de proteína na amostra corresponde a 72,81%, conforme cálculo apresentado abaixo.

$$\%Teor\ prote\acute{a}na = \frac{N(\%)_{experimental}}{N:P} \times 100 = \frac{11,65}{16} \times 100 = 72,81\%$$

Em que:

$N(\%)_{experimental}$: corresponde ao percentual de nitrogênio obtido experimentalmente;

$N:P$: corresponde ao fator de conversão N:P tradicional;

Para o método por sistema SIA com pervaporação o sinal analítico indica a concentração de aminoácidos na amostra em mmol L⁻¹ frente a curva de calibração. Esta resposta então é convertida ao correspondente em proteína. Para esta conversão é necessário conhecer as frações dos resíduos (AAs) na proteína em análise. Para proteína de cultivares brasileiras de soja, tem-se a estimativa das proporções mencionadas na tabela abaixo.

Tabela 5. Frações de aminoácidos em proteínas de cultivares brasileiras de soja

AAs	Massa Molar (g/mol)	Cultivar “Rio Balsas”		Cultivar “Bays”	
		g AAs/100 g Proteína	mol AAs/100 g Proteína	g AAs/100 g Proteína	mol AAs/100 g Proteína
Asp	132,10	11,34	0,086	11,85	0,090
Thr	119,10	3,81	0,032	3,76	0,032
Ser	105,08	4,23	0,040	4,50	0,043
Glu	146,13	18,30	0,125	19,02	0,130
Pro	115,12	5,33	0,046	5,31	0,046
Gly	75,06	3,88	0,052	3,78	0,050
Ala	89,08	4,25	0,048	4,10	0,046
Cys	121,15	1,63	0,013	1,44	0,012
Met	149,20	1,38	0,009	1,50	0,010
Val	117,14	4,66	0,040	4,60	0,039
Ile	131,16	3,79	0,029	3,75	0,029
Leu	131,16	7,68	0,059	7,63	0,058

Tyr	181,17	5,02	0,028	4,73	0,026
Phe	165,18	6,05	0,037	5,82	0,035
His	155,14	3,04	0,020	2,90	0,019
Lys	146,18	6,55	0,045	6,63	0,045
Arg	174,19	8,52	0,049	7,97	0,046
Trp	204,21	0,54	0,003	0,69	0,003
Total	N/A	100,00	0,759	99,98	0,759

Os valores tabelados das frações de cada aminoácido contido na oleaginosa e suas respectivas massas molares permitem a estimativa da concentração mmol L⁻¹ de AAs na amostra analisada, considerando hipoteticamente, que a amostra é constituída unicamente de proteína, ou seja, que 100% de sua massa corresponde ao polipeptídeo. Esta estimativa é então confrontada com a concentração experimental, resultando no teor (%) real de proteína na amostra. A concentração teórica foi estimada pela aplicação dados da tabela 5 na equação abaixo.

$$AAs \text{ na amostra (mol)} = \frac{m_a \times 0,759}{100}$$

Em que:

m_a : massa da amostra (g);

0,759 : correspondente em mol de AAs em 100 g.

A partir da quantidade estimada de AAs nas réplicas das soluções amostra e dos valores experimental obtidos pela metodologia de sistema SAI com pervaporação, o teor (%) de proteína foi determinado, e posteriormente comparado com o teor(%) de proteína segundo o método de Kjeldahl.

Quadro 2. Determinação de teor (%) de proteína na amostra por método de SIA com pervaporação

Amostra	m_a (mg)	Fator de Diluição (mL)	Concentração teórica (mmol L ⁻¹)	Concentração experimental (mmol L ⁻¹)	Teor (%) Proteína	Teor (%) médio Proteína	DPR
1	10,0		1,5180	1,09	71,81		
2	9,9	50	1,5028	0,99	65,88	70,03	4,20
3	10,1		1,5332	1,11	72,40		

Os resultados obtidos pelo método de Kjeldahl e SIA com pervaporação foram aplicados a equação descrita para o parâmetro exatidão.

$$\text{recuperação(\%)} = \frac{\text{Teor de AAs por método SIA}}{\text{Teor de AAs por método de Kjeldahl}} \times 100 = 96,20 \%$$

Os valores médios de teor de aminoácidos obtidos através de análise em triplicata das amostras de proteína concentrada de soja foram de 72,79% para método de Kjeldahl e 70,03% para SIA com pervaporação. Assim, a exatidão do método corresponde a 96,20%, e demonstra coerência com o método clássico de Kjeldahl amplamente utilizado nas análises de determinação de proteínas totais. Ainda, os valores obtidos correspondem às estimativas descritas em literatura, onde a forma concentrada de proteína de soja contém 70% ou mais de proteína. Proteína concentrada de soja contém ainda 0,3% de ácidos graxos poli-insaturadas (ácido linoléico, ácido oleico e ácido linolênico) e 6,7% de umidade, sendo os demais 22% constituídos basicamente de carboidratos insolúveis e fibras (SINGH, KUMAR, SABAPATHY, & BAWA, 2008). Todos estes componentes de matriz não estão compreendidos nas classes de substâncias que podem causar interferência e super estimação do conteúdo de proteína em análises através do método de Kjeldahl (FUJIHARA, KASUGA, & AOYAGI, 2001) e deste modo os resultados analíticos podem ser considerados isentos destes erros, correspondendo à quantificação exata da proteína.

A íntima relação entre os resultados obtidos pelas duas metodologias e para os parâmetros validados demonstram que o método proposto é capaz de quantificar com exatidão e precisão o conteúdo de aminoácidos em proteínas e, conseqüentemente, o teor de proteína total em amostras hidrolisadas de proteína de soja. Com redução significativa do gasto de amostra, a determinação por SIA com pervaporação pode ser empregado em determinações onde há limitações de amostragem, as quais Kjeldahl não pode ser utilizado.

7. CONCLUSÕES

O uso do sistema SIA automatizou a análise de composição de aminoácidos, possibilitando atingir-se frequência analítica de 12 amostras/h com redução do uso de reagentes e soluções quando comparado aos métodos fotométrico e Kjeldahl. Frente ao método fotométrico a análise em sistema SIA permite eliminar do uso de Cloreto estanhoso como agente redutor, reduzir em 10 vezes o volume de solução de AAs e 4 vezes o volume de solução de ninhidrina. Ao serem efetuadas comparações frente ao método de Kjeldahl, os valores para o consumo de reagentes e soluções pelo sistema SIA é muito inferior, dado aos procedimentos de decomposição de amostra e titulação empregados no método de Kjeldahl. Deste modo, o método proposto demonstra-se vantajoso e “limpo” quando comparado aos métodos convencionais de análise de aminoácidos e proteínas (American Association of Cereal Chemists, 1995); (SLYKE, MACFADYEN, & HAMILTON, 1941); (SMITH & AGIZA, 1951); (MOORE & STEIN, 1948).

As determinações de aminoácidos em hidrolisados de proteína concentrada de soja por sistema SIA com pervaporação apresentou resultados de teor de aminoácidos na amostra semelhantes aos obtidos quando da utilização do método convencional de Kjeldahl, amplamente aplicado em análises de alimentos, demonstrando que o método proposto é capaz de determinar quantitativamente de forma precisa e exata o teor de aminoácidos em hidrolisados de proteína de soja.

8. BIBLIOGRAFIA

- (ANVISA), A. N. (29 de 05 de 2003). *Resolução RE nº 899*. Acesso em 27 de Junho de 2013, disponível em [www.portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br):
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Equivalencia+farmaceutica/Legislacoes>
- ABATE, G., SANTOS, L. B., COLOMBRO, S. M., & MASINI, J. C. (2006). Sequential Injection Analysis as a Tool for On-Line Monitoring the Sorption of Fulvic Acid onto Modified Vermiculite. *Journal Brazilian Chemical Society*, 491-496.
- Acreditação, C. G. (03 de Fevereiro de 2010). *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. Acesso em 16 de Junho de 2013, disponível em www.inmetro.gov.br:
http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf
- ADACHI, M., TAKENAKE, Y., GIDAMIS, B. A., MIKAMI, B., & UTSUMI, S. (2001). Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b Homotrimer. *Journal of Molecular Biology*, 291-305.
- AJANDOUZ, E. H., TCHIAKPE, L. S., ORE, F. D., BENAJIBA, A., & PUIGSERVER, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Food Chemistry and Toxicology*, 926-931.
- American Association of Cereal Chemists. (1995). *Approved method of analysis*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- ANASTAS, P. T., & WARNER, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford-UK: Oxford University Press.
- BAADENHUIJESSEN, H., & SEUREN-JACOBS, H. E. (1979). Determination of total CO₂ in plasma by automated flow-injection analysis. *Clinical Chemistry*, 443-445.
- BARBETTA, P. A. (2010). *Estatística aplicada às Ciências Sociais*. Florianópolis: Editora da UFSC.
- BARRET, G. C., & ELMORE, D. T. (1998). *Amino acids and peptides*. Cambridge: Cambridge University Press.
- BAXTER, J. H., LAI, C., PHILLIPS, R. R., DOWLATI, L., CHIO, J. J., LUEBBERSA, S. T., et al. (2007). Direct determination of methionine sulfoxide in milk proteins by enzyme hydrolysis/high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 10-16.
- BERTOZZI, J. (2013). *Desenvolvimento de sistema de análise por injeção sequencial para aplicações analíticas*. Maringá-Paraná: Universidade Estadual de Maringá.
- CHIOU, S. H., & WANG, K. T. (1988). Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acids analysis of proteins. *Journal of Chromatography*, 404-410.
- COOPER, C., PACKER, N., & WILLIAMS, K. (2000). *Amino acids analysis protocols*. Humana Press.

- DARRACH, A. J., GARRICK, D. J., MOUGHAN, P. J., & HENDRIKS, W. H. (1996). Corrections for amino acid loss during acid hydrolysis of a purified protein. *Analytical Biochemistry* , 199-207.
- ELFAKIR, C. (2005). HPLC of amino acids without derivatization in quantitation of amino acids and amines by chromatography methods and protocols. *Journal of chromatography library* , 121.
- FIRESTONE, D. (2006). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*. Champaign: AOCS.
- FOUNTOULAKIS, M., & LAHM, H. W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* , 109-134.
- FRIEDMAN, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , pp. 385-406.
- FRIEDMAN, M., & BRANDON, D. B. (2001). Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *Journal of agricultural and food chemistry* .
- FRIEDMAN, M., & NOMA, A. T. (1975). Methods and problems in chromatographic analysis of sulfur amino acids. *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds* , 521-548.
- FUJIHARA, S., KASUGA, A., & AOYAGI, Y. (2001). Nitrogen-to-Protein Conversion Factor for common vegetables in Japan. *Journal of food science* , 412-415.
- HARDING, V. J. (1916). The ninhydrin reaction with amines and amides. *The Journal of Biological Chemistry* , 337-350.
- HARDING, V. J., & WARENFORD, F. H. (1916). The ninhydrin reaction with amino acids and ammonium salts. *The Journal of Biological Chemistry* , 319-335.
- HAYASHI, R., & SUZUKI, F. (1985). Determination of Methionine Sulfoxide in protein and food by hydrolysis with p-toluenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* , 521-528.
- HYLTON, K., & MITRA, S. (2007). Automated, on-line membrane extraction. *Journal of Chromatography A* , 199-214.
- IWASW, H., OZAWA, S., IKUTA, M., & ONO, I. (1995). Determination of amino acids in human plasma by liquid chromatography with postcolumn ninhydrin derivatization using a hydroxyapatite cartridge for precolumn deproteination. *Journal of Chromatography B* , 15-24.
- JOERGENSEN, L., & THESTRUP, H. N. (1995). Determination of amino acids in biomass and proteins samples by microwave hydrolysis and ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* , 421-428.
- LE BOUCHER, J., CHARRET, C., COUDRAY-LUCAS, C., GIBOUDEAUS, J., & CYNOBER, L. (1997). Amino acids determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clinical Chemistry* , 1421-1428.

- LEVEY, D. J., BISSEL, H. A., & O'KEEFE, S. O. (2000). Conversion of nitrogen to protein and amino acids in wild fruits. *Journal of Chemical Ecology* , 1749-1763.
- LOURENÇO, S. O., BARBARINO, E., DE-PAULA, J. C., PEREIRA, L. O., & MARQUEZ, U. M. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen to protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research* , 233-241.
- MACCALDIN, D. J. (1960). The Chemistry of ninhydrin. *Chemical Reviews* , 39-51.
- MACFADYEN, D. A., & FOWLER, N. (1950). On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α -amino acids II. A spectrophotometric study of ninhydrin reactions. *Journal of Biological Chemistry* , 13-22.
- MAGNÉ, C., & LARHER, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and Free Proline. *Analytical Biochemistry* , 115-118.
- MAKKAR, H. P., DAWRA, R. K., & SINGH, B. (1987). Protein precipitation assay for quantitation of tannin: determination of protein in tannin-protein complex. *Analytical Biochemistry* , 435-439.
- MARKS, D. L., BUCHSBAUM, R., & SWAIN, T. (1985). Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. *Analytical Biochemistry* , 136-143.
- MARKS, D., GLYPHIS, K., & LEIGHTON, M. (1987). Measurement of protein in tannin-protein precipitates using ninhydrin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 255-261.
- MATTOS, I. L., & LUQUE, M. D. (1994). Study of mass-transfer efficiency in pervaporation processes. *Analytica Chimica Acta* , 159-165.
- MOORE, S., & STEIN, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biology and Chemistry* , 367-388.
- MOSSÉ, J., HUET, J. C., & BAUDET, J. (1985). The amino acid composition of wheat grain as a function of nitrogen content. *Journal of Cereal Science* , 115-130.
- MOULIN, M., DELEU, C., LARHER, F. R., & BOUCHEREAU, A. (2002). High performance liquid chromatography determination of pipercolic acid after precolumn ninhydrin derivatization using domestic microwaves. *Analytical Biochemistry* , 320-327.
- OLIVEIRA, C. C., SARTINI, R. P., & ZAGATTO, E. A. (2000). Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of. *Analytica Chimica Acta* , 41-48.
- OLMOS, R. P., SOTO, J. C., ZÁCATE, N., ARAÚJO, A. N., & MONTENEGRO, M. C. (2005). Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review. *Analytica Chimica Acta* , 1-16.

- PAIS, T. F., VIGIGAL, S. S., TOTH, I. V., & RANGEL, A. O. (2013). Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in alcoholic beverages with in-line dilution. *Food Control* , 616-620.
- PASQUINI, C., & FARIA, L. C. (1987). Flow-injection determination of ammonia in Kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. *Analytical Chimica Acta* , 19-27.
- PECAVAR, A., PROSEK, M., FERCEJ-TEMELJOTOV, D., & MARSEL, J. (1990). Quantitative evaluation of amino acids using microwave accelerated hydrolysis. *Chromatographia* , 159-162.
- PENNANEC, R., PETRITIS, K., & DREUX, M. (2004). A validated analysis of underivatized amino acids using hplc with evaporative light scattering detection. In: *The applications Book* (pp. 2-3).
- Pharmacopeia, U. S. (2009). *Nitrogen determination*. Acesso em 13 de Fevereiro de 2014, disponível em U.S. Pharmacopeia: www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c461.html
- RUZICKA, J., & MARSHALL, G. D. (1990). Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* , 329-343.
- SAE-KHOW, O., & SOMENTAH, M. (2010). Pervaporation in chemical analysis. *Journal of Chromatography A* , 2736-2746.
- SALO-VAANANEN, P. P., & KOIVISTOINEN, P. E. (1996). Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (Nx6,25) values. *Food Chemistry* , 27-31.
- SANTOS, A. C., & MASINI, J. C. (2010). A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira. *Química Nova* , 1949-1956.
- SINGH, P., KUMAR, R., SABAPATHY, S. N., & BAWA, A. S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive reviews in food science and food safety* , 14-28.
- SKEGGS, L. T. (1957). An automatic method for colorimetric analysis. *American journal of clinical pathology* , 311-322.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., & WEST, D. M. (2006). *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Thomson.
- SLYKE, D. V., MACFADYEN, D. A., & HAMILTON, P. (1941). Determination of free amino acids by titration of the carbon dioxide formed in the reaction with ninhydrin. *Journal of Biology and Chemistry* , 671-680.
- SMITH, A. M., & AGIZA, A. H. (1951). The titrimetric determination of carbon dioxide liberated in the ninhydrin reaction with amino-acids. *Analyst* , 619-623.
- SRIPERM, N., PESTI, G. M., & TILLMAN, P. B. (2011). Evaluation of the fixed nitrogen-to-protein (N:P) conversion factor (6.25) versus ingredient specific N:P conversion factors in feedstuffs. *Journal of the science of food and agriculture* , 1182-1186.

STARCHER, B. (2001). A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Analytical Biochemistry* , 125-129.

The Role of Protein in Humans: How Proteins Help Maintain Life. (s.d.). Acesso em 21 de Fevereiro de 2013, disponível em www.brighthub.com:
www.brighthub.com/science/medical/articles/6050.aspx

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T., CARVALHO, A. F., MELO, V. M., et al. (2001). Nutritional study of two and toxic soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. *The Journal of nutritional biochemistry* , 55-62.

VIKRAM, V. B., RAMESH, M. N., & PRAPULLA, S. G. (2005). Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *Journal of food engineering* , 31-40.

WANG, L., CARDWELL, T. J., CATTRALL, R. W., CASTRO, M. D., & KOLEV, S. D. (2003). Determination of ammonia in beers by pervaporation flow injection analysis and spectrophotometric detection. *Talanta* , 1269-1275.

WEISS, M., MANNEBERG, M., JURANCILLE, J., LAHN, H., & FOUNTOULAKIS, M. (1998). Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A* , 263-275.

WEST, R. (1965). Siegfried Ruhemann and the discovery ninhydrin. *Journal of Chemical Education* , 386-388.

YEAOU, H. H., & WEE, Y. C. (1994). Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plant species. *Food Chemistry* , 245-250.

YEMM, E. W., & COCKING, E. C. (1955). The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* , 209-213.

YOKOYAMA, S., & HIRAMATSU, J. (2003). A modified ninhydrin reagent using ascorbic acid instead of potassium cyanide. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 204-205.

ZLATKIS, A., ORÓ, J. F., & KIMBALL, A. P. (1960). Direct amino acid analysis by gas chromatography. *Analytical Chemistry* , 162-163.