

João Alberto Suzin Marini

**DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM AMOSTRAS DE
CONTEÚDO ILEAL DE SUÍNOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE
MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO EM SISTEMA 96-WELL
PLATE**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek
da Rocha

FLORIANÓPOLIS
2018

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

Marini, João Alberto Suzin

Determinação de aminoácidos em amostras de conteúdo ileal de suínos utilizando a técnica de microextração em filme fino em sistema 96-WELL PLATE. / João Alberto Suzin Marini ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2018.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostras. 3. Aminoácidos. 4. TF-SPME. 5. Cortiça. I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

João Alberto Suzin Marini

Determinação de aminoácidos em amostras de conteúdo ileal de suínos utilizando a técnica de microextração em filme fino em sistema 96-WELL PLATE

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 8 de março de 2018.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr^a. Fabiane Goldschmidt Antes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof^a. Dr^a. Tatiane de Andrade Maranhão
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dedico este trabalho aos meus familiares por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa e aos meus filhos pelo apoio constante, incentivo, paciência, carinho e suporte em todos os momentos. Sempre desejando o meu melhor e não me deixando jamais desistir.

A minha família que me fizeram acreditar que era possível e me deram todo apoio para que este projeto se concretizasse.

Aos amigos do CroMaas, que me aceitaram de braços abertos e compartilharam comigo seus conhecimentos. Podem ter certeza que levarei seus ensinamentos para toda a vida..

Ao meu professor e orientado Dr. Eduardo Carasek, pela oportunidade, pelo conhecimento repassado e pela enorme paciência que teve comigo durante estes últimos 2 anos.

Aos meus colegas do Laboratório de Análises Físico-Químicas da Embrapa Suínos e Aves, principalmente a Dra. Gizelle Bedendo, que me auxiliaram sem medir esforços em todas as minhas dificuldades durante todo o período de curso.

Ao meu conselheiro acadêmico junto a Embrapa Dr. Everton Krabbe, pelo apoio e pela confiança em mim depositados.

A UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e pela bagagem de conhecimento que me foi transmitida.

A EMBRAPA por acreditar em meu projeto, e me propiciar este período de aprendizagem, que com certeza será muito útil durante toda a minha carreira profissional.

RESUMO

Uma nova abordagem para TF-SPME é apresentada usando a cortiça como fase extratora para a determinação de aminoácidos de interesse da suinocultura (glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e lisina) em amostras de conteúdo ileal de suínos. Utilizou-se TF-SPME combinado com o sistema 96 Well Plate, permitindo alta frequência analítica devido à possibilidade de extrações simultâneas de até 96 amostras e a quantificação dos aminoácidos foi feita por cromatografia líquida em analisador específico. A cortiça, sorvente utilizada com fase extratora mostrou-se eficiente e estável, sendo possível a reutilização da mesma por 15 ciclos de análise. O método otimizado consistiu, em 1mL da amostra hidrolisada como volume inicial, 60 minutos de tempo de extração sob agitação de 250 rpm, com pH menor que 1 e temperatura de 21°C. Para dessorção é utilizada uma solução tampão de citrato de sódio pH 2,2 durante 30 minutos sob agitação de 250 rpm. Os limites de detecção variaram de 0,04 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para a fenilalanina até 0,09 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para a valina. Os limites de quantificação obtidos foram de 0,12 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para a fenilalanina até 0,29 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para a valina, com R^2 variando de 0,968 para glicina a 0,999 para a isoleucina e leucina. Esta nova abordagem surge como uma alternativa bastante promissora para a análises em laboratórios de rotina, uma vez que a fase extratora é de baixo custo e fácil acesso e biodegradável, além de o método de preparo de amostras poder ser totalmente automatizado, permitindo uma análise múltipla, precisa, rápida e com economia de reagentes.

Palavras-chave: Preparo de amostras, aminoácidos, TF-SPME, 96-well plate, cortiça.

ABSTRACT

In this study a new approach to TF-SPME is presented with a recommendation for the determination of amino acids of interest in swine production (glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine and lysine) in swine ileal content samples. TF-SPME combined with the Well Plate 96 system was used, allowing high analytical frequency due to the possibility of simultaneous extraction of up to 96 samples and an amino acid quantification was done by liquid chromatography in specific analysis. The sorbent phase used (cork) was efficient and stable, being possible to be reused at least for 15 cycles. The optimized method consisted of: 1 mL of the sample as the initial volume, 60 minutes of extraction, 250 rpm of stirring, $\text{pH} < 1$ and room temperature (21°C). The sodium citrate buffer solution ($\text{pH} 2.2$) was used for desorption during 30 minutes under stirring at 250 rpm. Detection limits ranging from $0.04 \mu\text{mol mL}^{-1}$ for phenylalanine to $0.09 \mu\text{mol mL}^{-1}$ for valine. The limits of quantification obtained were from $0.12 \mu\text{mol mL}^{-1}$ for phenylalanine up to $0.29 \mu\text{mol mL}^{-1}$ for valine and the correlation coefficient ranging from 0.968 for glycine at 0.999 for and isoleucine and leucine. This new approach emerges as a very promising alternative for analysis in routine laboratories, since it is a sorbent phase of low cost, easy access and biodegradable. Besides, the extraction steps of the method are possible to be fully automated, it allows the analysis of many samples simultaneously showing accuracy, quickness and with reagent economy.

Keywords: Sample preparation, amino acids, TF-SPME, 96-well plate, cork.

Lista de Figuras

Figura 1 . Fórmula geral de um aminoácido.....	28
Figura 2. Fórmulas estruturais dos Aminoácidos e sua classificação....	29
Figura 3. Esquema do analisador de aminoácidos.....	33
Figura 4. Sistema instrumental para SPME.....	35
Figura 5 . Modos de extração do método SPME.....	36
Figura 6.- Representação da extração por DI-SPME.....	37
Figura 7. Geometria retangular para as películas de TF-SPME com tamanhos de 1 cm de altura e 2 mm de largura.....	41
Figura 8. Sistema manual 96-well plate; b) pinos contendo o filme fino da fase extratora; c) escova contendo as 96 lâminas; d) poços para introdução da amostra.....	42
Figura 9. Representação dos poros da cortiça através de microscópio eletrônico de varredura (SEM), nas direções não radial (NR direction) e radial (R direction).....	44
Figura 10. Simplex-Centroid utilizada para otimizar mistura de três componentes.....	45
Figura 11. Mostrando o método padrão para análise de aminoácidos em hidrolisado proteico do analisador de aminoácidos Hitachi I-8900.....	49
Figura 12. Adaptação do Sistema 96 Well Plate.....	50
Figura 13. Sistema Vácuo/Nitrogênio etapa previa a selagem das ampolas.....	53
Figura 14: fluxograma de preparo do pó da cortiça que será utilizada como sorvente.....	54
Figura 15 – Fluxograma de preparo dos filmes de TF-SPME com cortiça.....	55
Figura 16 – Cromatogramas dos analitos estudados, utilizando solução padrão Sigma –Aldrich, analisada pelo método proposto e pelo oficial AOAC 994.12.....	58
Figura 17 – Cromatogramas dos analitos estudados, utilizando amostra de hidrolisado de conteúdo ileal de suínos, analisada pelo método proposto e pelo oficial AOAC 994.12.....	59
Figura 18 – Modelo Simplex-centroid para escolha do solvente de dessorção. Neste experimento realizou-se uma extração de 60 min. e uma dessorção de 30 min.	62

Lista de tabelas

Tabela 1 - Tabela de Valores de pK_a para os diversos grupos ionizáveis dos 20 α -aminoácidos que formam as proteínas e seus pontos isoelétricos.....	30
Tabela 02 - Planejamento experimental e resposta do simplex-centroid:.....	61
Tabela 03 – Tabela ANOVA para o modelo Simplex-simploid.....	62
Tabela 04- Valores obtidos para LOD, LOQ, faixa linear e coeficiente de determinação para o método proposto, para determinação de aminoácidos em amostras de conteúdo ileal.	66
Tabela 05 – Teste de repetibilidade em amostra de digesta suína, em três níveis de fortificação.(n=7).....	67
Tabela 06 - Recuperação relativa em amostra de digesta suína, em três níveis de fortificação.....	68
Tabela 7 - Concentração de aminoácidos nas amostras reais analisadas pelo método AOAC 994.12	69
Tabela 08 – Concentração de aminoácidos nas amostras reais analisadas pelo método proposto aplicando a técnica de TF-SPME.....	70
Tabela 09 – Resultados dos testes T pareados, entre as determinações de aminoácidos estudados pelo método oficial e pelo método proposto.....	70
Tabela 10 – Resultados dos testes T pareados, entre as amostras analisadas pelo método oficial e pelo método proposto.....	71
Tabela 11 - Comparação das amostras entre os métodos proposto (MP) e o método oficial(MO), levando-se em conta o Intervalo de confiança(IC) 95%.(n=2).....	72
Tabela 12- Comparação entre as equações das curvas de calibração do método oficial e do método proposto.....	73
Tabela 13 – Comparação de parâmetros de mérito entre o método proposto e o método oficial.....	74

Lista de gráficos

GRÁFICO 01 – Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de extração.	60
GRAFICO 02 – Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de dessorção.	64
GRAFICO 03 - Comparativo entre pente com 15 ciclos realizados, com recém confeccionados. Para este experimento se utilizou um pente com seis pinos novos e seis usados sob condições ótimas do ciclo de análise.....	65

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AA – Aminoácido.

Ala – Aminoácido Alanina.

CI – Cromatografia Iônica.

DI - Imersão direta, do inglês *Direct Imersion*.

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva.

DPX – Extração com ponteira descartável, do inglês *Extraction by disposable tip*

D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *solid phase dispersive extraction*.

EM – Energia Metabolizável.

GC - Cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*.

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

Gli – Aminoácido Glicina.

HF-SPME – Técnica de microextração em fase líquida suportada por membrana oca.

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*.

HS - do inglês, *Headspace*.

Ile – Aminoácido Isoleucina.

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-FL - Cromatografia Líquida acoplado a Fluorescência, do inglês *Liquid Chromatography - Fluorescence*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

Leu – Aminoácido Leucina

Lis – Aminoácido Lisina

LLE – extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*.

LOQ - Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantitation*.

MS – Espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*.

NIR – Infravermelho próximo, do inglês *Near Infrared*

PB – Proteína bruta.

Phe – Aminoácido Fenilalanina.

R² - Coeficiente de determinação.

RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*

RSD – Precisão, do inglês *Relative Standard Deviation*.

SDME – Técnica de microextração em gota unica.

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*.

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*.

SLE – Extração sólido-líquido.

TF-SPME – Microextração em filme fino, do inglês *Thin-Film Microextraction*.

Try – Aminoácido Tirosina.

UV – Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet*.

Val – Aminoácido Valina.

Vis – Visível, do inglês *Visible*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Nutrição de suínos.....	25
2.2 Aminoácidos:.....	27
2.2.1 Métodos de determinação de aminoácidos.....	31
2.2.1.1 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência	32
2.2.1.2 Determinação de aminoácidos por analisador específico para este fim.....	32
2.3 Técnicas de preparo de amostra.....	33
2.3.2 <i>Técnicas modernas de preparo de amostras</i>	34
2.3.3 <i>Microextração em Fase Sólida – SPME</i>	34
2.3.4 <i>Microextração em fase sólida por filme fino. (TF-SPME)</i>	40
2.4 Sistema de 96–well plate.....	41
2.5 Biossorventes aplicados na química analítica.....	43
2.6 Biossorvente cortiça aplicado a metodologias analíticas.....	43
3 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	45
4 OBJETIVOS.....	47
4.1 Objetivo geral.....	47
4.2 Objetivos específicos.....	47
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1 Instrumentação.....	48
5.2 Reagentes, Solventes e Materiais.....	50
5.3 ANALITOS ESTUDADOS.....	51
5.4 Amostras.....	51
5.3.1 <i>Procedimento de hidrólise das amostras</i>	52
5.4 Confeção e limpeza dos pentes utilizados na etapa de extração.....	53

5.5 – Método de preparo da amostra pelo método oficial AOAC 994.12.....	55
5.6 – Método de preparo da amostra pelo método proposto.....	56
5.7 Otimizações das variáveis para a análise.....	56
<i>5.7.1 Tempo de extração da amostra.....</i>	<i>56</i>
<i>5.7.2 Otimização do solvente e tempo de dessorção.....</i>	<i>56</i>
<i>5.7.3 Durabilidade dos pentes.....</i>	<i>57</i>
5.8 Parâmetros analíticos de mérito.....	57
6- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
6.1 Otimizações da etapa de extração.....	59
6.2 Otimizações da condições de dessorção dos aminoácidos.....	61
6.3 Estabilidade da cortiça como fase extratora.....	64
6.4 Parâmetros de mérito do método proposto.....	66
6.5 Determinação de aminoácidos em amostras reais aplicando o método proposto e o oficial.....	69
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

As principais fontes de proteína produzidas e consumidas no Brasil são as carnes de suíno e de frango. O país produz cerca de 3,7 milhões de toneladas de carne suína por ano, sendo 732,9 mil toneladas destinadas à exportação, posicionando-o como 4º maior produtor e exportador mundial. Em relação à carne de frango, são mais de 12,9 milhões de toneladas produzidas, sendo o 2º maior produtor e maior exportador mundial, com 4,382 milhões de toneladas exportadas anualmente (ABPA, 2017). As duas atividades juntas consomem cerca de 36,3 milhões de toneladas de ração (CONAB, 2015).

A produção de suínos e aves no Brasil vem crescendo anualmente a passos largos, e grande parte deste crescimento vem da melhoria na área nutricional, incluindo novos alimentos, aditivos biotecnológicos e avanços na nutrição de precisão, em busca da chamada proteína ideal (ROSTAGNO, 2007).

Na elaboração de rações para animais monogástricos é de fundamental importância o conhecimento do valor nutricional dos alimentos, representado pelo conteúdo de aminoácidos, coeficientes de digestibilidade dos nutrientes e valores energéticos. O valor nutritivo da proteína de um alimento depende de sua composição em aminoácidos (AA), de sua digestibilidade e disponibilidade (COSTA; GOULART, 2010).

Tem se investido muito em produtos capazes de melhorar a digestibilidade dos alimentos, aumentando assim o seu rendimento e diminuindo o desperdício. Atualmente as empresas tem investido em enzimas capazes de melhorar a digestibilidade dos alimentos, aumentando assim a densidade nutricional sem o aumento do teor proteico destes, inibindo ou suprimindo o efeito dos fatores anti-nutricionais (SOUZA, 2011).

A formulação de ração com base em um nível mínimo de Proteína Bruta (PB) normalmente resulta em valores de proteína altos, em função da adoção de margens de segurança para garantir o fornecimento dos AAs essenciais. Estratégias para maximização do desempenho com a formulação de dietas com margens de segurança no fornecimento de aminoácidos, de modo a atender as exigências dos animais com maior demanda nutricional já foram estudadas. Entretanto, o uso de margens de segurança tem se demonstrado pouco efetivo, uma vez que produz resultados inconsistentes sobre o desempenho dos

animais, além de reduzir a eficiência de utilização do nitrogênio dietético e aumentar os custos de formulação sem modificações relevantes na margem de lucro (Sirri e Meluzzi, 2012).

No entanto, há que se salientar que os animais não têm requerimentos nutricionais para PB em si, e sim para cada um dos AAs essenciais constituintes das proteínas e para uma quantidade de nitrogênio amino suficiente para a biossíntese de AAs não essenciais (COSTA; GOULART, 2010).

Seguindo esta lógica, surgiu o conceito de proteína ideal proteína ideal proposta pelos nutricionistas, que é definida como balanço exato de aminoácidos que é capaz de prover sem excesso ou falta, os requerimentos de todos os aminoácidos necessários para a manutenção animal e máxima deposição proteica (SUIDA, 2001).

A formulação por proteína ideal tem algumas vantagens como permitir expressar o potencial máximo de crescimento do animal, melhorar a conversão alimentar e reduzir custo alimentar, flexibilidade na formulação de dietas, redução do nível proteico das dietas, utilização de maior variedade de ingredientes e redução da excreção de nitrogênio (ROSTAGNO, 2007). Todos estes aspectos repercutem em um sistema de produção mais sustentável.

A importância da quantificação dos aminoácidos na área de nutrição animal é essencial e imprescindível. As determinações são extremamente trabalhosas, demoradas, com um custo muito elevado e somando-se a isso tem-se dificuldades de encontrar prestador deste serviço para as matrizes de interesse da suinocultura, principalmente conteúdo ileal.

A utilização de técnicas de miniaturização no preparo de amostras com a finalidade de diminuição de resíduos, limpeza e concentração da amostra tem sido usada cada vez mais em diferentes tipos de matrizes. Estas técnicas são usualmente acopladas a sistemas que aumentem a frequência analítica como é o caso do sistema 96-Well Plate.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nutrição de suínos

O Brasil, apesar de ser um dos maiores produtores de suínos do mundo, até meados de 1983 não possuía uma tabela de referência nutricional própria para suínos, baseando-se em informações de composição de alimento e de exigências nutricionais estabelecidas no exterior, principalmente em tabelas oriundas dos Estados Unidos e União Européia. A partir de 1983, através do esforço de professores e pesquisadores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa/MG, surgiu a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais para Suínos e Aves, cuja última atualização foi em 2017. Esta tabela baseia-se nos níveis de Energia Metabolizável (EM), minerais, vitaminas e proteína baseada em seus aminoácidos, variando de acordo com a fase de crescimento e o sexo do animal.

Na produção de suínos, a alimentação é o fator que mais onera o custo de produção, sendo que cerca de 70% do custo é oriundo da alimentação (Embrapa, 2016). Estes altos custos são normalmente advindos das fontes proteicas utilizadas nas formulações das rações para o plantel. Por isso é primordial para o equilíbrio financeiro da produção o uso correto e adequado desta fonte de nutriente, principalmente os dados referentes a concentração de cada aminoácido presente nas diversas fontes proteicas.

Além da questão econômica, a nutrição desbalanceada de suínos também afeta diretamente o equilíbrio ambiental, com o aumento da deposição de amônia no solo, ar e água oriunda da ingestão excessiva de proteínas pelos animais. Assim, além de contaminar o meio ambiente, ocorre em prejuízo para o produtor, pois o animal ingere alimento acima do necessário e o excedente proteico é desaminado, sendo metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins, com a cadeia carbonada utilizada como fonte de energia. Essa rota metabólica gera um gasto energético muito grande para o organismo animal. Alguns estudos, por exemplo, relatam que o excesso de proteína bruta nas dietas de monogástricos deprimem o desempenho por aumentar as exigências de energia de manutenção do animal, deixando um menor nível energético para funções de deposição muscular (ARAÚJO et al., 2001).

Embora tenha-se o interesse de reduzir à proteína adicionada a alimentação de suínos, para esta diminuição deve-se levar em conta a necessidade mínima de alguns aminoácidos chamados essenciais que

são limitantes no desempenho do animal. Entre estes destaca-se primeiramente a lisina, o que se deve à sua alta presença na proteína corporal e seu destino metabólico preferencial para a deposição de tecido muscular. Os outros são a metionina, treonina e triptofano, os quais não são produzidos pelo organismo, sendo providos unicamente através da alimentação.

Partindo da premissa de utilização consciente da proteína bruta na alimentação animal, surgiram vários conceitos e tecnologias, dentre eles redução da concentração de proteína bruta das rações, aumento da digestibilidade dos aminoácidos, formulação com base na proteína ideal, utilização de enzimas exógenas como a fitase.

O conceito de proteína ideal, para o uso na nutrição animal, estabelece que todos os aminoácidos essenciais sejam expressos como proporções ideais ou percentagens de um aminoácido-referência. Atualmente, o aminoácido utilizado como referência é a lisina (Parsons e Baker, 1994).

A utilização da fitase, enzima capaz de degradar o ácido fítico um fator anti-nutricional presente nas matérias primas de origem vegetal, que além de indisponibilizar o fósforo ele também se liga a nutrientes de carga positiva e forma complexos insolúveis com minerais, proteínas, aminoácidos e amidos; e ainda pode se ligar a enzimas digestivas (amilase, tripsina, pepsina, fosfatase ácida e outras) e diminuir a atividade destas. A fitase tem sido utilizada com sucesso nas rações de suínos para liberar parte do fósforo complexado na forma de fitato e melhorar a digestibilidade da proteína bruta e dos aminoácidos e a absorção de minerais (KRABBE, 2012).

Estes novos conceitos e tecnologias empregados na nutrição de suínos vem para auxiliar os produtores a atender as novas demandas de carne suína mundial, conforme projeções da FAO de aumento de consumo de carne no mundo, e consequentemente de carne suína.

Segundo Rostagno et al. (2011) as formulações com redução de proteína bruta obtiveram bons resultados de desempenho, bem como uma redução significativa na contaminação ambiental causada pela excreção de nitrogênio, desde que mantidos os níveis recomendados de aminoácidos essenciais.

Com o melhor entendimento do conceito de digestibilidade de aminoácidos na determinação da composição de alimentos e das exigências nutricionais para animais, foram obtidos avanços significativos. Passou-se a considerar que os aminoácidos contidos na proteína só podem ser absorvidos no intestino delgado, ou utilizados ao longo do trato gastrointestinal, após a digestão completa das proteínas,

ou seja, quando o aminoácido estiver livre. Isso permitiu valorar corretamente as matérias-primas quanto ao aproveitamento dos aminoácidos. Além disso permitiu a substituição da formulação de rações com base em aminoácidos totais, que tinha por base exclusivamente a lisina e metionina, mantendo um valor de mínimo protéico. Vale lembrar que vários fatores são responsáveis pela variação no valor da digestibilidade dos nutrientes nos alimentos, e entre estes podemos citar aqueles relacionados aos animais como a genética, idade, níveis nutricionais das rações e temperatura ambiente (NOGUEIRA et al, 2012).

Para o desenvolvimento, aprimoramento e acompanhamento destas tecnologias é de fundamental importância a análise para determinação de aminoácidos na digesta suína, objetivo do desenvolvimento e validação do método de preparo de amostras deste projeto de pesquisa.

2.2 Aminoácidos:

Para a nutrição de monogástricos existem 20 aminoácidos de interesse e estes podem ser de dois tipos, aminoácidos essenciais e não essenciais.

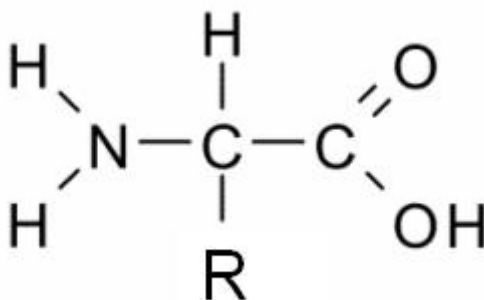
Os aminoácidos essenciais são os que não são sintetizados pelo animal ou são sintetizados em níveis baixos, já os não essenciais são sintetizados pelo organismo dos animais através de outros aminoácidos (TORRINHAS, 2004).

Alguns destes aminoácidos essenciais são denominados limitantes, AA limitantes podem ser definidos como os AAs que estão presentes na ração em uma concentração inferior à exigida pelos animais para expressarem seu potencial de produção. Os requerimentos variam de acordo com a fase de crescimento e o tipo de animal, por exemplo, para aves os principais são a metionina, lisina, treonina e arginina/glicina (COSTA et al., 2012), já para suínos são a lisina, treonina, metionina e triptofano. Considerando dietas constituídas por milho e farelo de soja em aves o primeiro aminoácido limitante é a metionina e em suínos, geralmente, é a lisina (NOGUERO et al., 2012).

Os aminoácidos exercem as diversas funções no metabolismo, servindo para a construção de peptídeos e proteínas, atua como precursores de mediadores hormonais e outras moléculas funcionais, e também como fonte de produção de energia (CAMPBELL, 2007).

Analisando quimicamente, os aminoácidos são compostos que apresentam, em sua molécula, um grupo amina (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH); a única exceção é a prolina, que contém um grupo imino (-NH-) no lugar do grupo amina, um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado cadeia lateral ou grupo R (Figura 01).

FIGURA 01 – Fórmula geral de um aminoácido



Fonte: Autoria própria

Existem vários critérios de classificação para os aminoácidos, dos quais dois são quimicamente importantes. O primeiro deles é a natureza polar ou apolar da cadeia lateral. O segundo depende da presença de um grupo ácido ou básico na cadeia lateral (MARZZOCO, 2007).

Quanto à primeira classificação os aminoácidos podem ser divididos segundo suas cadeias laterais da seguinte maneira (Figura 02): 1-Aminoácidos apolares, que contêm grupo R constituídos por cadeias com caráter de hidrocarbonetos e hidrofóbicos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina e triptofano),

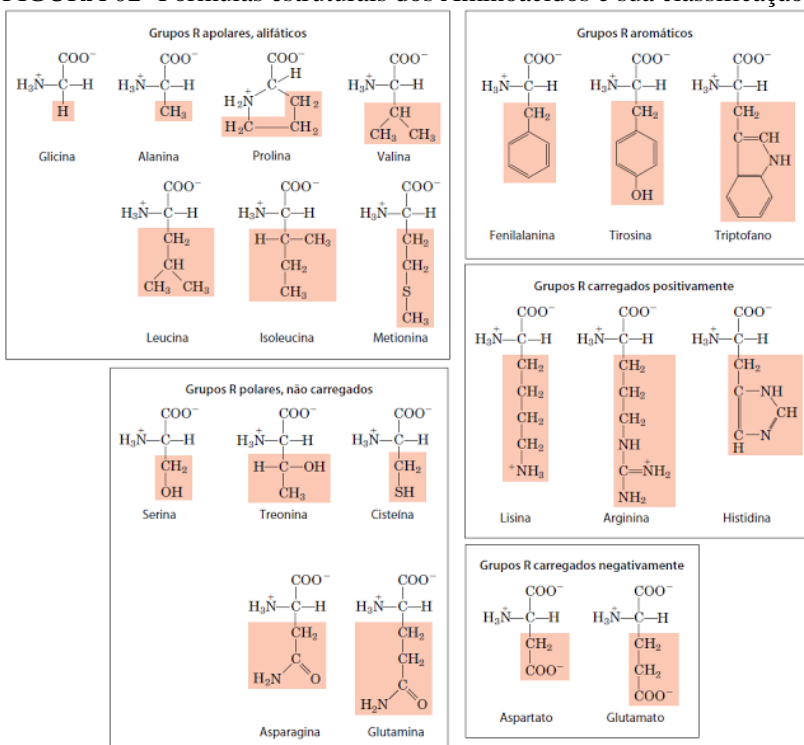
2-Aminoácidos polares são sub-classificados em três classes de acordo com a característica do grupo R em pH 7: aminoácidos básicos, com carga positiva (lisina, arginina, histidina); aminoácidos ácidos, carga negativa (aspartato e glutamato); e aminoácidos polares, sem carga (serina, treonina e tirosina) (CAMPBELL, 2007).

Na Tabela 01 são apresentados os pKa's dos aminoácidos para que a classificação através da polaridade das cadeias laterais e a

evidência do grupo ácido ou básico na cadeia lateral auxilie na interpretação da sua classe. O pKa é valor do pH em que um ácido se apresenta 50% dissociado e é uma medida da sua força ácida: quanto maior for o valor do pKa, mais fraco será o ácido (MARZZOCO, 2007).

Os aminoácidos sem grupos carregados em suas cadeias laterais existem em solução neutra como zwitterions (anfóteros) sem nenhuma carga líquida. Um zwitterion tem cargas positivas e negativas iguais, ele é eletricamente neutro quando em solução (MARZZOCO, 2007).

FIGURA 02 -Fórmulas estruturais dos Aminoácidos e sua classificação.



Fonte: LEHNINGER, et al. 2000

Tabela 01 -Tabela de Valores de pK_a para os diversos grupos ionizáveis dos 20 α -aminoácidos que formam as proteínas e seus pontos isoelétricos.

Aminoácido	Tipo	Abreviatura	Letra	pK_{a1} (-COOH)	pK_{a2} (-NH ₂)	pK_{ar} (R)	pl
Glicina	Neutros apolares	GLI	G	2,34	9,78		6,06
Alanina		ALA	A	2,35	9,69		6,02
Valina		VAL	V	2,32	9,62		5,97
Leucina		LEU	L	2,36	9,64		6,00
Isoleucina		ILE	I	2,36	9,68		6,02
Metionina		MET	M	2,28	9,21		5,75
Prolina		PRO	P	1,99	10,60		6,30
Fenilalanina	Neutros aromáticos	PHE	F	1,83	9,29		5,53
Tirosina		TRY	Y	2,20	9,11	10,07	5,65
Triptófano		TRP	W	2,38	9,39		5,89
Serina	Neutros polares	SER	S	2,21	9,15		5,68
Cisteína		CYS	C	1,96	10,28	8,18	5,07
Treonina		TRE	T	2,71	9,62		6,16
Asparagina		ASG	N	2,02	8,80		5,41
Glutamina		GLN	Q	2,17	9,13		5,65
Ácido aspártico	Ácidos	ASP	D	2,09	9,82	3,86	2,97
Ácido glutâmico		GLU	E	2,19	9,67	4,25	3,22
Lisina	Básicos	LYS	K	2,18	8,95	10,53	9,74
Arginina		ARG	R	2,17	9,04	12,48	10,76
Histidina		HIS	H	1,82	9,17	6,00	7,58

Fonte : HENRIQUEZ, 2018

Dado sua importância na nutrição animal, são os aminoácidos entre os nutrientes de uma dieta os que mais impactam o desempenho animal. Por isso é de extrema importância o conhecimento da composição de aminoácidos dos alimentos, tanto os usualmente utilizados como os alternativos e rações, bem como seu aproveitamento pelo animal.

Nutricionistas baseiam-se em aminoácidos digeríveis para a formulação de rações, para otimizar o uso de matérias-primas de alto custo e ainda pelo fato de possibilitar a substituição dos alimentos triviais das rações (milho e da soja) por ingredientes alternativos, garantindo equivalência de aminoácidos digestíveis, mesmo que em alguns casos tenham que fazer correções das deficiências com a suplementação de aminoácidos sintéticos (SAKOMURA; ROSTAGNO, 2007).

A digestibilidade dos aminoácidos é determinada pela diferença de aminoácidos consumida pelos animais e a excretada nas fezes ou pelo

conteúdo ileal, ou seja, é a quantidade de aminoácidos que o animal utilizou para a sua nutrição (TAVERNARI, 2008).

A necessidade evidente do conhecimento exato do conteúdo de aminoácidos impulsiona a necessidade do refinamento analítico para exatidão nas análises e aumento da frequência analítica. Para alcançar essa combinação torna-se essencial estudos dedicados com ampla busca por conhecimentos da área assim como troca de experiências entre laboratórios.

2.2.1 Métodos de determinação de aminoácidos

De acordo com o descrito anteriormente, com a utilização crescente do conceito de proteína ideal para a preparação de rações para não ruminantes, demandou-se o conhecimento do perfil aminoacídico dos alimentos utilizados como fontes proteicas. Através deste conhecimento tornou-se possível uma adição mais exata dos aminoácidos sintéticos comercializados atualmente.

Uma das áreas de conhecimento que se dedica a estudos para determinação de composição, identificação e quantificação é a química analítica. Esta compreende o conjunto de técnicas e medidas que visam caracterizar a natureza e determinar a composição de amostras de diferentes origens, em termos de elementos, espécies, ou agrupamentos de átomos e moléculas a partir do desenvolvimento de metodologias com sistemáticas bem definidas (ARAÚJO, et al., 2007).

Métodos tradicionais de análise incluem procedimentos químicos utilizados para separar os nutrientes em questão e mensurar o montante destes em uma dada quantidade nos alimentos. Os métodos tradicionais são trabalhosos, demorados e produzem resíduos tóxicos. Dentre os métodos utilizados para a avaliação do conteúdo aminoacídico das amostras destacam-se:

- Cromatografia Iônica;
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Espectroscopia de Refletância do Infravermelho Próximo (NIRS) (ARAÚJO, et al., 2007).

As determinações de aminoácidos por cromatografia iônica estão ultrapassadas, nos dias atuais utiliza-se a técnica por HPLC, técnica esta empregada nos analisadores de aminoácidos atuais. Quanto

a técnica NIR, ela necessita de análises por outros métodos para alimentar o seu banco de dados, salienta-se ainda que esta *técnica é de predição*.

2.2.1.1 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência

Em se tratando da análise para determinação de aminoácidos, após um moroso, mas imprescindível preparo de amostra, esta é injetada ao cromatógrafo para que ocorra a separação dos componentes. Dado a estrutura dos compostos aminoácidos estes precisam de um processo extra, que normalmente ocorre após a coluna, onde são derivatizados para que se tornem cromóforos e a partir deste processo gerarem um sinal no detector.

Apesar da inquestionável evolução da técnica de cromatografia, um equipamento concebido para ser um cromatógrafo líquido convencional ainda apresenta algumas desvantagens frente a equipamentos com designer específico para análises de aminoácidos. Entre essas desvantagens podemos citar a diminuição da intensidade do sinal dos picos ao longo de uma batelada de amostras, devido a exposição da nihidrina que sofre processos de degradação e altera a eficiência da derivatização ao longo do tempo. Este fato torna ainda mais trabalhosa a análise e exige cuidado extremo para se ter exatidão na análise. (HARRIS, 2008)

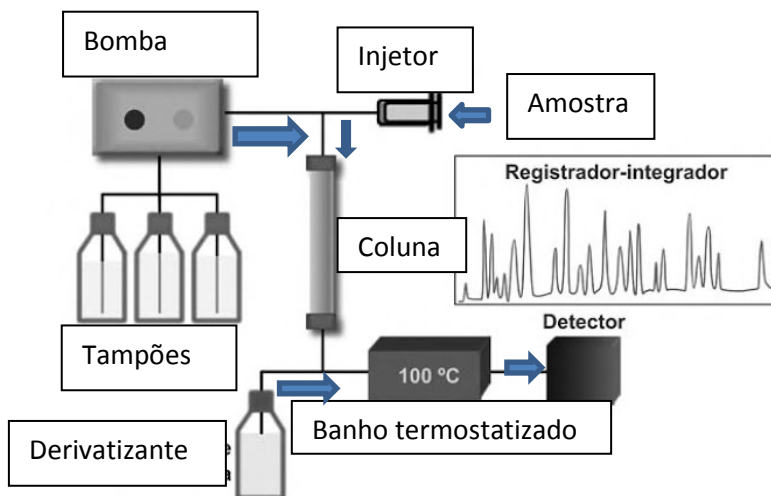
2.2.1.2 Determinação de aminoácidos por analisador específico para este fim

Os analisadores de aminoácidos foram desenvolvidos utilizando a técnica de HPLC, podem trabalhar com diversos tampões diferentes na fase móvel, o que representa uma gama maior de eluentes diferentes ou de diferentes pHs de um mesmo eluente, auxiliando na separação dos elementos na coluna de separação (Figura 03). Utilizam colunas de alta eficiência desenvolvidas especificamente para estas análises, o que resulta em uma melhor separação dos aminoácidos (ROCCA, 2003).

Outra vantagem do Analisador de aminoácidos sobre a técnica do HPLC convencional é a estabilidade da nihidrina, derivatizante utilizado neste trabalho. A nihidrina é misturada ao seu tampão no momento da análise, diminuindo assim a possibilidade de sua degradação, diferente do que ocorre no HPLC convencional onde a

solução fica pronta em frasco por um grande intervalo de tempo, fazendo com que a intensidade dos picos diminuam com o passar do tempo, pela degradação da nihidrina (ARAUJO, 2007).

FIGURA 03 – Esquema de um analisador de aminoácidos



Fonte: Adaptado de ROCCA, 2003

Os analisadores de aminoácidos realiza as análises em menor tempo e com uma melhor separação devido ao uso de diversos tampões e da coluna de alta eficiência, não necessita utilizar padrões para verificação da eficiência da nihidrina com a mesma frequência do HPLC convencional, tendo um menor custo de análise, tempo e reagentes em comparação a técnica de HPLC convencional.

Outra especificidade dos analisadores de aminoácidos é quanto a sua configuração, que pode ser para análises de hidrolisado proteico ou fluidos fisiológicos, onde o número e as soluções dos tampões variam, assim como as colunas que são específicas para cada configuração. O que garante uma melhor separação e menores tempos de corrida cromatográfica para cada matriz.

2.3 Técnicas de preparo de amostra

Embora tenhamos um avanço significativo nos últimos tempos em equipamentos e detectores capazes de analisar os mais diferentes compostos presentes nas mais diferentes matrizes, a maioria das metodologias ainda necessita de algum pré-preparo na amostra, principalmente as mais complexas como é o caso do conteúdo ileal, que é composto pelo resto do alimento degradado pelo estomago do suíno (porção do alimento que não foi absorvida pelo animal) ou com concentrações muito baixas (REZAEE et al., 2010, MERIB e CARASEK, 2013).

O preparo de amostra tem por finalidade extrair os analitos de uma matriz, e ainda minimizar ou anular os efeitos da mesma na análise, esses efeitos podem suprimir ou exacerbar a resposta a certo analito na presença de constituintes da matriz (MERIB e CARASEK, 2013).

Segundo Kokosa et al., 2009, as diversas técnicas de preparo de amostras tem como objetivos a simplificação da amostra, concentração do analito, limpeza da amostra e representatividade da amostra.

Podemos distinguir as técnicas de preparo de amostras em 2 grupos, as chamadas técnicas clássicas que utilizam um grande volume de solventes orgânicos e amostras e as técnicas modernas ou miniaturizadas de preparo de amostras.

2.3.2 Técnicas modernas de preparo de amostras

Dado as várias desvantagens relacionadas ao preparo de amostras pelas técnicas clássicas, foram desenvolvidas técnicas mais modernas de preparos de amostras, visando miniaturizar os processos e assim reduzir o uso de solventes orgânicos tóxicos e potencialmente poluidores, assim como o volume de amostra. Podemos destacar algumas destas técnicas como a microextração em gota única (SDME), a microextração em fase sólida (SPME), microextração em filme fino, (TF-SPME) a microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Merib e Carasek, 2013). Neste estudo serão abordadas mais detalhadamente as SPME e TF-SPME, as quais foram utilizadas neste trabalho.

2.3.3 Microextração em Fase Sólida – SPME

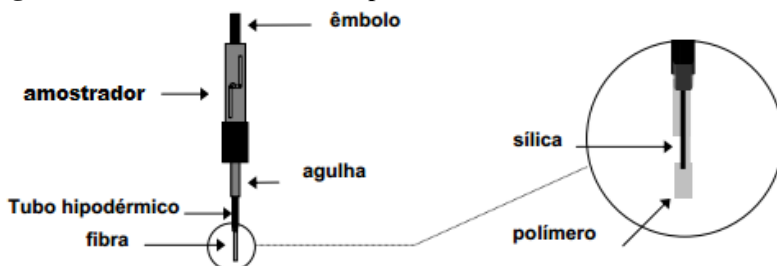
A técnica foi proposta no final da década de 1980 e início dos anos 1990 (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990). Ela tem sido aplicada à

amostragem e análise ambiental, alimentícia, biológica, forense e farmacêutica.

É uma técnica simples, relativamente rápida e que dispensa o uso de solventes extratores orgânicos, além da fibra poder ser reutilizada (MOHAMMADI et al., 2005). A técnica baseia-se no princípio da adsorção/absorção dos analitos por uma fase extratora a qual reveste uma fibra e a sua subsequente dessorção (KATAOKA et al., 2000). Uma grande vantagem desta técnica é que combina amostragem, isolamento e enriquecimento em uma única etapa, tornando-se atraente como alternativa às técnicas convencionais de preparo de amostras.

A técnica baseia-se no equilíbrio de partição/distribuição dos analitos entre a fase extratora e a matriz (OUYANG e PAWLISZYN, 2008). A fase extratora pode ser formada por um sólido sorvente de alta porosidade ou por polímeros líquidos de alta massa molar. Microquantidades de fase extratora são fixadas sobre um suporte de sílica fundida, stableflex ou haste de metal que são expostas a amostra para extrair os analitos (Figura 04). Esta fibra após o processo de extração pode ser diretamente inserida no equipamento e analisada por cromatografia gasosa ou líquida, diminuindo possíveis perdas de analitos quando comparado a outras técnicas que necessitam de várias etapas. (OUYANG *et al.*, 2006).

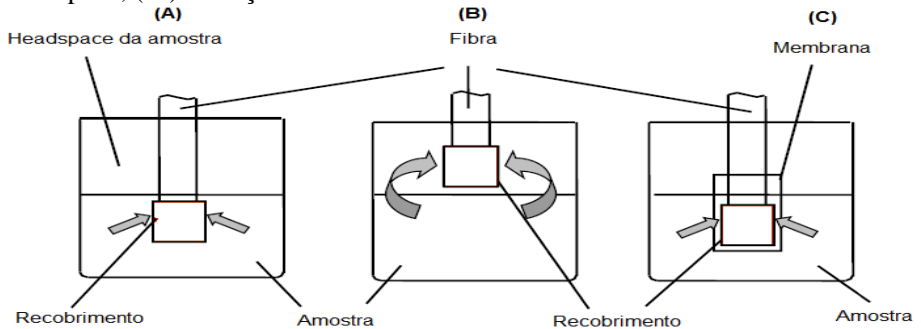
Figura 04 - Sistema instrumental para SPME.



FONTE: ADAPTADO DE SIGMA ALDRICH, 2018

A SPME possui três modos de extração que são: Imersão Direta (DI, *do inglês Direct Immersion*), *Headspace* (HS) e proteção com membrana. Na DI a fibra fica imersa na amostra, enquanto na HS fica exposta no espaço vazio acima da amostra. Já na proteção com membrana a fibra fica imersa na amostra, porém sem contato pois a membrana a protege. (Figura 05)

FIGURA 05 – Modos de extração para SPME: (A) Imersão Direta; (B) Headspace; (C) Proteção com membrana.

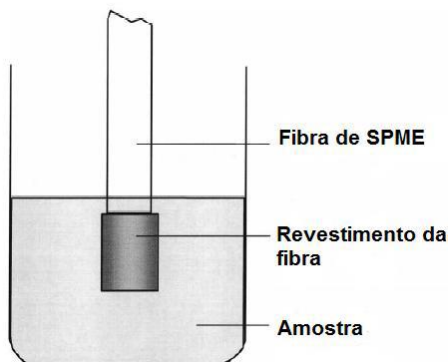


Fonte: PAWLISZYN (2009).

O modo de extração é determinado pela volatilidade do analito e complexidade da amostra. Quando o analito é pouco volátil e a amostra não é danosa à fibra utiliza-se a DI. Já quando o analito tem alta volatilidade e/ou a amostra é danosa à fibra utiliza-se o modo HS e a proteção de membrana é utilizada quando a amostra possui analitos pouco voláteis e interferentes não voláteis e com alta massa molar ou é dificultada a utilização dos outros dois modos. (PAWLISZYN, 2009)

O equilíbrio químico na SPME é descrito por um sistema de equações de acordo com o modo empregado (OUYANG *et al.*, 2008). Utilizou-se o modo DI neste trabalho, e por isso maior ênfase será dada a equação que descreve o equilíbrio neste modo. Sendo o DI, um sistema bifásico, considera-se completo o processo de extração quando a concentração do analito atinge o equilíbrio entre a amostra e a fibra. (Figura 06)

FIGURA 06- Representação da extração por DI-SPME.



Fonte: PAWLISZYN (2009).

As equações 1 a 6 descrevem este processo, onde inicialmente se tem a concentração do analito em equilíbrio na amostra e na fibra, através da constante de distribuição K_{fs} (equação 1):

$$Conc_{amostra} \rightleftharpoons Conc_{fibra}$$

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad (1)$$

Conforme a lei de conservação das massas, tem-se no sistema de equilíbrio descrito pela equação 2:

$$C_0 V_s = C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f \quad (2)$$

Onde cada variável representa

C_0 = concentração inicial do analito

V_s = volume da amostra

C_s^∞ = concentração no equilíbrio do analito na amostra

C_f^∞ = concentração no equilíbrio do analito no recobrimento

V_f = volume do recobrimento da fibra

Rearranjando a equação (1), para isolar a concentração no equilíbrio do analito na amostra, tem-se (equação 3):

$$C_s^\infty = \frac{C_f^\infty}{K_{fs}} \quad (3)$$

Substituindo-se a equação (3) na equação (2), tem-se (equação 4):

$$\begin{aligned} C_0 V_s &= \frac{C_f^\infty V_s}{K_{fs}} + C_f^\infty V_f \\ K_{fs} C_0 V_s &= C_f^\infty V_s + K_{fs} C_f^\infty V_f \\ K_{fs} C_0 V_s &= C_f^\infty (V_s + K_{fs} V_f) \\ C_0 V_s &= \frac{C_f^\infty V_s + K_{fs} C_f^\infty V_f}{K_{fs}} \\ C_f^\infty &= C_0 \frac{K_{fs} V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (4) \end{aligned}$$

Através da relação entre concentração e número de mols, tem-se (equação 5):

$$C_f^\infty = \frac{n_f}{V_f} \quad (5)$$

Onde:

n_f = número de mols do analito no equilíbrio extraído pelo recobrimento.

Por fim, substituindo-se a equação (5) na equação (4), tem-se (equação 6):

$$\frac{n_f}{V_f} = C_0 \frac{K_{fs}V_s}{K_{fs}V_f + V_s}$$

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs}V_s V_f}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (6)$$

Nestas equações descritas matematicamente, principalmente as equações 4 e 6, indicam a massa de analito que foi sorvida posterior ao equilíbrio ter ocorrido. Como o n_f é proporcional à concentração inicial do analito na amostra, é possível realizar a quantificação do analito de interesse do método com a técnica de SPME.(DIAS, 2015)

O sistema de equilíbrio baseou-se em aspectos termodinâmicos e cinéticos. Aspectos termodinâmicos que afetam o equilíbrio de partição entre a fibra e a amostra (K_{fs}) incluem temperatura, força iônica (adição de sal), pH e presença de solvente orgânico em água. Os aspectos cinéticos são a agitação da amostra e tempo de equilíbrio, ambos correlacionados.

Quando aumentando-se a temperatura durante a extração tem-se um aumento da difusão do analito ao redor da fibra. No modo de extração utilizando o headspace da amostra, a temperatura ajuda na transferência dos analitos da matriz da amostra para o seu headspace. Entretanto, um aumento na temperatura reduz a constante de distribuição porque a etapa de sorção dos analitos na fibra é um processo exotérmico, o que diminuiria a sorção dos analitos, porém no modo ID vai depender da capacidade de difusão do analito (PEÑALVER, et al., 1999).

Quando há a adição de um eletrólito forte à amostra tem-se a diminuição da solubilidade de compostos pouco polares, forçando-os a passar a fase vapor ou a fibra. Porém a adição de eletrólitos pode ser desfavorável para compostos muito polares e/ou ionizados, uma vez que sua atividade na solução aumenta (KOMATSU, 2004).

Levando-se em conta que somente a forma não dissociada de um composto pode ser extraída pelo recobrimento da fibra, pode-se ajustar o pH para que os analitos com características ácidas ou básicas possam ser extraídos. O ajuste do pH de uma solução aquosa afetará a constante K para espécies dissociáveis.

Através destas definições, analitos básicos necessitam estar em pH básico para serem extraídos, assim como analitos ácidos necessitam estar em pH ácido, verifica-se que uma condição ideal para analitos ácidos é a utilização de um pH da amostra 2 unidades menores que o valor de pK_a . Em contrapartida, para analitos básicos um pH 2 unidades acima do pK_a favorecerá a extração, tendo em vista que a forma neutra do analito predominará (DIAS, 2015).

Quanto aos aspectos cinéticos, independente do mecanismo físico-químico presente na extração, tanto adsorção ou absorção, o tempo de necessário para atingir o equilíbrio de distribuição dos analitos entre amostra e fibra vai depender da velocidade com que as moléculas do analitos são transportadas por essas fases e atravessam as interfaces dos componentes do sistema (BORGES et al., 2015).

Pode-se utilizar a agitação do sistema de amostras para aumentar a velocidade na qual os analitos migram da amostra para a fase extratora, tais como fluxo da amostra, agitação do frasco da amostra, sonificação e movimentação da fibra. Assim reduz-se os efeitos da camada limite, uma região que se forma entre a superfície da fase extratora e a amostra, na qual a difusão do analito é menor, criando uma espécie de “barreira” para a transferência da substância alvo (PAWLISZYN, 2012). Portanto se for considerado uma agitação perfeita, a fase aquosa se move tão rapidamente em relação ao recobrimento da fibra que todos os analitos têm acesso à fase extratora.

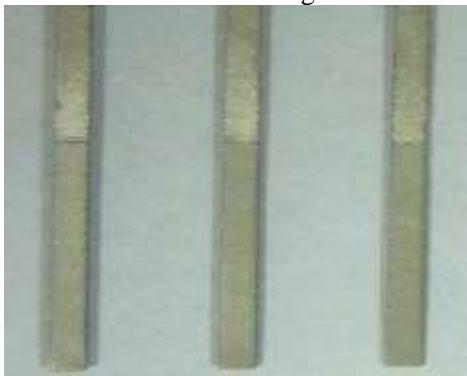
Visando um aumento na capacidade de sorção dos analitos, foram surgindo novas técnicas de microextração, e uma técnica foi derivada da SPME, e que foi utilizada neste trabalho foi a microextração em filme fino (TF-SPME).

2.3.4 Microextração em fase sólida por filme fino. (TF-SPME)

A técnica foi introduzida por *Pawliszyn et al.* (2003). com o objetivo de tornar a técnica mais sensível. Alterando a geometria cilíndrica presente na SPME, a TF-SPME modifica propriedades significativas referentes a melhora na extração dos analitos (JIANG e PAWLISZYN, 2012).

A geometria retangular e em forma de uma película fina (Figura 07), a TF-SPME apresenta uma espessura da fase extratora menor em relação a SPME, o que representa uma área superficial maior da fase extratora. Reduzindo o tempo de extração dos analitos e aumentando a quantidade extraída (BOYACI, et al, 2016).

FIGURA 07 - Geometria retangular para as películas de TF-SPME com tamanhos de 1 cm de altura e 2 mm de largura.



Fonte: MIRNAGHI, 2012

Conforme as equações definidas anteriormente no item 2.3.3, para o modo DI da técnica SPME, que se aplica também a esta técnica, pode-se avaliar os parâmetros que foram alterados pela técnica TF-SPME.

Conforme a equação 6 do modo DI da técnica SPME:

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs}V_sV_f}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (6)$$

Ao aumentar o volume da fase extratora, V_f , aumenta-se a quantidade de mols de analito extraído pelo recobrimento, o que é representado pela proporcionalidade do n_f , provando a melhora na eficiência da extração e também demonstrando a quantificação através da técnica (Jiang e Pawliszyn, 2012).

Com o avanço e desenvolvimento da TF-SPME, estudou-se o acoplamento de outros instrumentos, como foi o caso do sistema de 96-well plate com a finalidade de melhorar a frequência analítica.

2.4 Sistema de 96-well plate

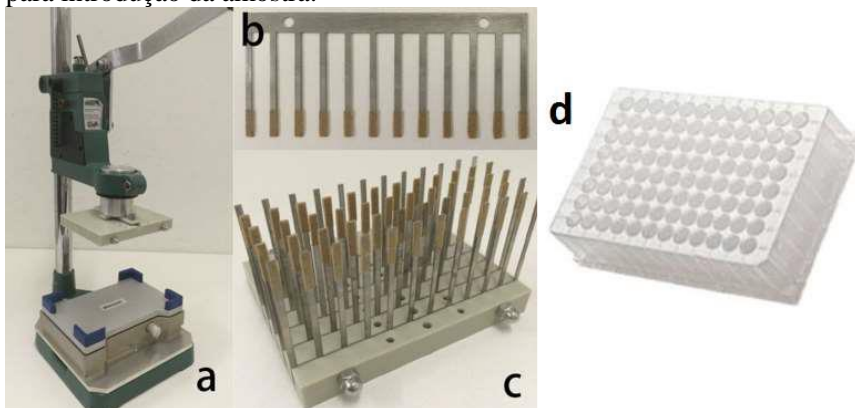
Visando agilizar e maximizar a frequência analítica recentemente, um sistema foi desenvolvido para a utilização da SPME, principalmente no formato de filmes finos, que são característicos da TF-SPME (MIRNAGUI, et al., 2013).

O sistema de 96-well plate é composto de um amostrador automático ou manual e seu objetivo é a extração simultânea de até 96

amostras. Através de conjunto de espaços, denominado poços, com volumes que podem variar de 0,250 a 2 mL, onde introduz-se a amostra contendo os analitos. Em uma escova, contendo um conjunto de 96 pinos, onde são incorporados os filmes da fase extratora.

O sistema também pode ser utilizado para a etapa de dessorção, sendo introduzido o solvente de dessorção nos poços com volumes que podem variar de 0,250 a 2mL, imergindo-se as películas de fase extratora para a dessorção dos analitos. Na Figura 08 estão apresentadas as principais partes para um sistema manual de *96-well plate*. (MIRNAGUI, et al., 2012)

FIGURA 08 - a) Sistema manual *96-well plate*; b) pinos contendo o filme fino da fase extratora; c) escova contendo as 96 lâminas; d) poços para introdução da amostra.



Fonte: Mores, 2016.

Atualmente a técnica de TF-SPME vem sendo utilizada acoplada com um sistema de placas de 96 poços (96-Well plate), assim fornecendo a preparação simultânea de 96 amostras (Morés; Dias e Carasek, 2017).

Este sistema também foi utilizado para extração de aminoácidos livres por um polímero sintético aderido a uma lamina de aço inoxidável acoplado ao sistema 96 Well Plate em amostras de polpa de uva (Mousavi, et al., 2013).

Este sistema permite o recobrimento dos pinos dos pentes pelos mais diversos tipos de sorventes, inclusive os biossorventes que é objeto deste trabalho.

2.5 Biossorventes aplicados na química analítica

Biossorventes são materiais formados por macromoléculas que contêm vários grupos funcionais que são hábeis para interagir com compostos através de diferentes fenômenos como sorção, complexação e troca iônica (DEMIRBAS, 2008).

Os principais usos desses biossorventes têm sido na determinação de metais em matrizes biológicas e ambientais. Poucos estudos utilizam biossorvente para extração de compostos orgânicos, e esses poucos se caracterizam pelo uso de biossorventes para remoção de poluentes da água (DIAS, 2015).

Estes revestimentos vêm sendo desenvolvido como alternativa ao uso de revestimentos comerciais empregados em técnicas de microextração, como por exemplo a microextração em fase sólida, SPME (MORES, 2016).

Um biossorvente que vem sendo utilizado recentemente e que possui boa sorção de compostos orgânicos é a cortiça (MERIB, J., CARASEK, E., 2013).

2.6 Biossorvente cortiça aplicado a metodologias analíticas

A cortiça é a casca do sobreiro (*Quercus suber* L.), e é uma matéria-prima natural, renovável e biodegradável. Este biossorvente tem uma estrutura celular alveolar semelhante à do favo de mel, e as suas células são constituídas principalmente dos biopolímeros hidrofóbicos, suberina (40%) e lignina (24%), ceras e outros produtos (15%) e ainda, polissacarídeos (20%) (celulose e hemicelulose) que conferem um caráter hidrófilo a este biossorvente. Esta composição tem uma forte influência sobre as propriedades mecânicas (DIAS, 2015).

Este biossorvente já foi utilizado em vários trabalhos, utilizando a técnica de SPME (DIAS, et al., 2013, DIAS, et al., 2014, DIAS, et al., 2015, MORÉS, 2016). A cortiça possui diversas qualidades, entre elas destacam-se as de ser um material leve, viscoelástico, impermeável a líquidos e gases, bom isolante térmico, acústico e elétrico, e além disso, é natural, renovável e biodegradável. Por possuir estas características tem sido utilizada em diversas técnicas onde foi possível determinar que possui uma boa adsorção de compostos orgânicos poluentes, devido sobretudo à presença de lignina em sua composição e também pela presença de poros em sua estrutura, mostrada na Figura 09 obtida por

microscopia eletrônica de varredura (OLIVELLA, et al, 2012; FERNANDES, et al., 2015).

Figura 09 - Representação dos poros da cortiça através de microscópio eletrônico de varredura (SEM), nas direções não radial (NR direction) e radial (R direction).



Fonte: FERNANDES, 2015

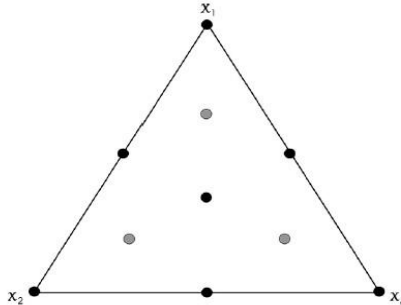
Por possuir grande heterogenicidade de composição e estrutura, a cortiça é um material promissor para uso em química analítica, por ser ecologicamente correto, visto que não necessitam ser derrubadas árvores para a sua retirada, já que a cortiça é oriunda da casca da árvore e após a sua retirada ela se regenera, este sorvente propicia o desenvolvimento de um novo revestimento em diversas técnicas de preparo de amostra e vai de encontro ao proposto pela química verde (OLIVELLA, et al, 2012).

3 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Existem métodos univariados e multivariados, para otimizações de metodologias. No modo univariado avalia-se apenas um parâmetro por vez e não se leva em consideração a influência das interações entre as variáveis (Bezerra et al., 2008). Como métodos multivariados de otimização há diversos, sendo que um dos mais utilizados é metodologia de superfície de resposta.

Outro planejamento muito utilizado para otimizar uma mistura de três componentes e que foi utilizado neste trabalho é a superfície triangular (simplex-centroid), conforme Figura 10. Obtém-se a superfície de resposta, onde cada vértice do triângulo (x_1 , x_2 , x_3) representa um componente puro, ou seja, a proporção é 1:0:0. No ponto situado entre os vértices ocorre uma mistura entre dois componentes na proporção de 1:1:0. No ponto central do triângulo tem-se a mistura de três componentes na proporção de 1:1:1.

FIGURA – 10. Simplex-centroid utilizada para otimizar mistura de três componentes.



Fonte: Adaptado de FERREIRA et al. (2007).

Utilizou-se um planejamento simplex-centroide para a avaliação da dessorção dos analitos, utilizando três diferentes dessorvente, puros e em diferentes combinações, e os resultados foram analisados graficamente. Os dessorventes utilizados foram o tampão citrato de sódio pH 2,2, acetonitrila e metanol.

Após a otimização do método analítico este deve ser validado baseado em alguns parâmetros de mérito. Quando se necessita de validação total do método, a mais comum é a "*single-laboratory method validation*" (IUPAC, 2002). Para laboratórios de pesquisa onde esta

validação completa não é necessária, normalmente são considerados alguns parâmetros de mérito: limites de detecção e quantificação, faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), exatidão e precisão. O limite de detecção pode ser calculado como sendo 3 vezes o desvio padrão do primeiro ponto da curva analítica (no método de adição de padrão), e o de quantificação como 10 vezes o desvio padrão do primeiro ponto da curva analítica (no método de adição de padrão). Os valores dos coeficientes de determinação (r^2) relatados na literatura são no mínimo $> 0,9$ (ALMEIDA e NOGUEIRA, 2014; ÇABUK et al., 2012). A exatidão é avaliada em termos de porcentagem de recuperação, considerando valores aceitáveis entre 80 e 120%, com uma precisão associada $< 20\%$ (SANCO, 2013).

A comparação entre métodos também é muito utilizada em trabalhos científicos para validação de novas metodologias e/ou adaptações, comparando sempre uma nova e/ou adaptada com uma método oficial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um método alternativo de extração de aminoácidos em conteúdo íleal de suínos, aplicando a técnica de microextração em filme fino (TF-SPME), em conjunto com o sistema 96 well plate, utilizando a cortiça como fase extratora e quantificação pelo Analisador de Aminoácidos Hitachi 1-8900.

4.2 Objetivos específicos

- Otimização dos parâmetros de extração (tempo de extração) e dessorção (solvente, tempo) para microextração em filme fino.
- Avaliar os parâmetros de mérito, como limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), exatidão (através da recuperação) e precisão (RSD%) do método proposto.
- Avaliar a durabilidade dos pentes de extração, com o número de extrações que podem ser feitos com os pentes sem que haja perda da eficiência.
- Aplicação do método desenvolvido em amostra reais, comparando com método oficial AOAC 994.12.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Instrumentação

O experimento foi conduzido nas dependências da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia–SC, pois os materiais e equipamentos necessários para as determinações de aminoácidos fazem parte da estrutura da empresa e foram cedidos para a realização do trabalho.

Um analisador de aminoácidos da Hitachi 18900 configurado para análises de hidrolisado proteico foi utilizado para realização das determinações,

O método utilizado foi o método indicado pelo fabricante para análise de hidrolisado proteico, não sendo otimizado, utilizando a coluna standard 4,8X80 da Hitachi, com uma temperatura da coluna de reação de 135°C e da coluna de separação de 57°C, com um fluxo constante de Nihidrina de 0,220 ml/min e um fluxo da fase móvel de 0,250 ml/min utilizando gradiente de fase móvel e fluxo constante. O método está apresentado a seguir (Figura 11).

FIGURA 11 : Método padrão para análise de aminoácidos em hidrolisado proteico do analisador de aminoácidos Hitachi 1-8900.

The screenshot displays the software interface for the Hitachi 1-8900 amino acid analyzer. It includes various control panels for columns, autosampler, pump, and detector, along with a detailed data table.

Column: Guard Column (Guard Column(0000)), Main Column (Main Column(0000-0)), Ammonia Filter Column (Ammonia Filter Column), Reactor (Reaction Column(000)).

Autosampler: Syringe Volume (500 µL), Syringe Speed (3), Needle Down Speed (Fast). Wash: Wash Port Wash Strokes (3), Wash Port Wash Speed (4), Needle Wash Time (1). Injection: Time Injection With Pump (PASS) (unchecked), Sense Missing Vial (checked). Plunger Wash: Wash Volume (500 µL).

Pump: Pressure Limit (Min/Max): Pump1 (2.0/19.0 MPa), Pump2 (0.2/4.9 MPa). Buffer/Reagent: Pump1 (Buffer), B1-PH-1, B2-PH-2, B3-PH-3, B4-PH-4, B5-H2O, B6-PH-RG. Pump2 (Reagent), R1-Nin, R2-Nin-Buffer, R3-5%EtOH.

Detector: Ch1 Stop Time (60.0 min), Ch2 Stop Time (30.0 min), Sampling Period (400), Reactor Heater Temperature (135 °C). Method Type: Normal (selected), For Stand-by, For RG. RG Data Sampling (unchecked), Auto Generation (checked).

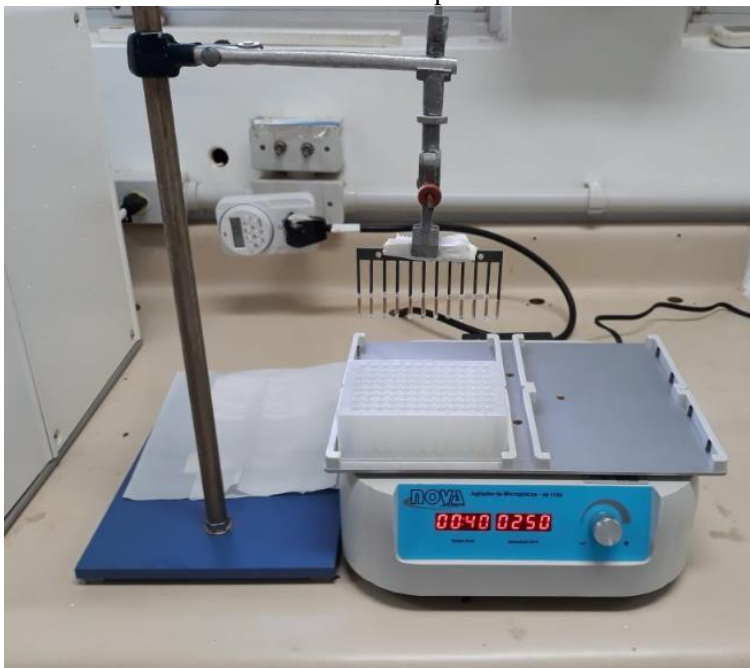
	Time (min)	%B1	%B2	%B3	%B4	%B5	%B6	Flow (mL/min)	Temp (°C)	%R1	%R2	%R3	Flow (mL/min)
Pump1	0.0	50	50	0	0	0	0	0.250	57	50	50	0	0.220
Pump2	2.0	50	50	0	0	0	0			50	50	0	
	2.1	0	100	0	0	0	0						
	5.0	0	100	0	0	0	0						
Pump1 (Buffer)	5.1	0	0	100	0	0	0						
B1	13.8	0	0	100	0	0	0						
B2	13.9	0	0	50	50	0	0						
B3	24.0	0	0	50	50	0	0						
B4	24.1	0	0	0	100	0	0						
B5	36.0	0	0	0	100	0	0			50	50	0	
B6	36.1	0	0	0	0	0	100			50	50	0	
Pump2 (Reagent)	49.0	0	0	0	0	0	100			50	50	0	
R1	49.1	0	0	0	0	0	100			0	0	100	
R2	50.0	0	0	0	0	0	100						
R3	50.1	0	100	0	0	0	0						
	51.0	0	100	0	0	0	0						
	51.1	100	0	0	0	0	0						
	54.0									0	0	100	
	54.1									50	50	0	
	70.0	100	0	0	0	0	0			50	50	0	

Fonte: Print screen da tela do software da openlab.

Outros equipamentos foram utilizados durante o experimento, os quais podem ser listados: balança analítica de 4 casas decimais, marca Bel, pHmetro digital de bancada, modelo HI 113, marca HANNA, forno estufa marca Ethiktechnology, pipetadores automáticos de 20 -200 µl da Eppendorf, de 100 -1000 µl da Peguepet e de 1-10 ml da Eppendorf e agitador de microplacas da Nova Instrumentos, modelo NI-1154.

O sistema 96-well plate de preparo de amostras, foi adaptado do fabricante Brüder Mannesmann Werkzeuge (Remscheid, Alemanha), conforme Figura 12.

FIGURA 12 – Sistema 96 Well Plate adaptado.



Fonte: autoria Própria

O sistema consiste em uma mesa agitadora de microplacas, onde são encaixadas as placas com os 96 poços, serve tanto para os poços de 2 mL quanto para os de 0,300 mL, ela possui temporizador e medidor de velocidade de agitação digital. O pente que foi confeccionado conforme o item 5.4 é preso a uma garra metálica, que por sua vez esta fixado a um suporte universal, o pente tem a altura regulável manualmente.

5.2 Reagentes, Solventes e Materiais

Os padrões certificados NIST dos aminoácidos glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina e também o padrão interno norleucina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), bem como uma solução padrão contendo 18 aminoácidos. A acetonitrila grau HPLC também foi obtida da Sigma-Aldrich.

Os reagentes e solventes utilizados foram: metanol grau HPLC (J. T. Baker), água ultrapura foi obtida a partir do sistema Milli-Q da

Millipore, ácido clorídrico P.A. da Vetec, hidróxido de sódio P.A. ACS (Alphatec).

Os reagentes para preparação dos tampões da fase móvel do analisador de aminoácidos com pH de 3,3(tampão 1), 3,2(tampão 2), 4,0(tampão 3) e 4,9(tampão 4) foram os seguintes: citrato de sódio diidratado P.A. da Vetec, hidróxido de sódio P.A. da Vetec, cloreto de sódio P.A. ACS, ácido cítrico P.A. da Vetec, etanol absoluto ACS da Merck, benzyl álcool P.A. da Vetec, tioglicol pureza >95% da Sigma-Aldrich, Brij-35 da Sigma-Aldrich, ácido capríco P.A. da Synth. Os reagentes para a niidrina, derivatizante do analisador de aminoácidos, foram os seguintes: propilenoglicol metil éter da Sigma-Aldrich, niidrina P.A. da Sigma-Aldrich, boroidreto de sódio P.A. ACS da Biotec, acetato de lítio diidratado da Sigma-Aldrich, ácido acético glacial P.A. ACS da Biotec.

A cortiça, utilizada neste trabalho, foi preparada seguindo a metodologia de Dias et al. (2015). A cortiça foi obtida de rolhas descartáveis de vinhos, sendo seu pó produzido por uma lixa de madeira e peneirado com granulometria média de 200 mesh.

Filtro de seringa 0,22 μm hidrofílico, seringa descartável de 1 ml, vial de vidro de 1,5 ml com tampa e septo, frascos de vidro de 20 ml, beakers de 20, 50, 100 e 1000 ml, balões volumétricos de 100 e 1000 ml e provetas de 500 e 1000 ml também foram utilizados.

5.3 Analitos estudados

Neste trabalho foi desenvolvido método para a determinação de 8 aminoácidos(glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e lisina) em amostras de conteúdo ileal de suíno e a técnica de preparo empregada foi TF-SPME.

5.4 Amostras

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas as amostras de conteúdo ileal de suínos provenientes de estudos de metabolismo realizados na Embrapa Suínos e Aves, em projeto que contempla a avaliação de diferentes doses e tipos de enzimas no desempenho e digestibilidade de nutrientes em suínos. Foi realizada a determinação de nitrogênio total (pela técnica de combustão, pelo equipamento DUMAS) e calculada a proteína bruta para estas amostras.

5.3.1 Procedimento de hidrólise das amostras

As hidrólises para determinação de aminoácidos pelo método da AOAC 994.12 são divididas em 3 grupos: 1 – para análise dos aminoácidos chamados convencionais e que resistem a ação do HCl 6 mol L⁻¹; 2 – para análise de aminoácidos sulfurados, que são parcialmente degradados pela ação do HCl 6 mol L⁻¹, e que precisam de um protetor para resistir a hidrólise e 3 – para o triptofano, que é totalmente degradado pela ação do HCl 6 mol L⁻¹, sendo para este aminoácido utilizada uma hidrólise básica.

As amostras foram hidrolisadas seguindo determinação da AOAC 994.12, para amostras convencionais, tendo em vista que os aminoácidos de interesse do trabalho se enquadravam nesta condição.

As amostras foram pesadas em uma ampola de vidro de 10 ml, numa fração correspondente a 20 mg de proteína, adicionado 10 mL de HCl 6 mol L⁻¹. Após, as ampolas passaram por um sistema nitrogênio/vácuo (conforme Figura 13), a fim de retirar todo o oxigênio presente na ampola para que não ocorra possíveis perdas de aminoácidos por oxidação durante o processo de hidrólise e então seladas com maçarico. Então as ampolas foram para a estufa previamente aquecida a 110°C e em banho de areia sendo mantidas nessa condição por 22 horas. Após foram retiradas da estufa e acondicionadas em geladeira até análise. Preconiza-se um tempo de no máximo 1 semana para análise, caso o tempo seja superior, as amostras são congeladas para evitar sua deterioração.

Após rompidas as ampolas com as amostras, estas devem ser filtradas em papel filtro de porosidade média para retirar o material particulado mais grosseiro, para posterior seguimento da análise.

FIGURA 13 – Sistema vácuo/nitrogênio usado na etapa prévia à selagem das ampolas.



Fonte: Autoria própria.

5.4 Confeção e limpeza dos pentes utilizados na etapa de extração

A cortiça utilizada tem origem em rolhas de garrafas de vinho oriundas do comércio da cidade de Concórdia/SC. Por isto, antes de serem utilizadas elas foram colocadas em frasco com água ultra-pura e deixadas por um período de 2 horas em banho ultrassônico. Este procedimento foi repetido quantas vezes necessário até que não se verificasse mais a cor escura na água. Em seguida, as rolhas de cortiça foram mantidas num forno estufa regulado a 110 ° C durante 12 horas. Após elas foram lixadas em lixa de madeira e peneiradas em uma peneira de granulometria de 200 mesh, para se conseguir um tamanho médio uniforme das partículas. Procedimento conforme Figura 14:

FIGURA 14: fluxograma de preparo do pó da cortiça que será utilizada como sorvente.



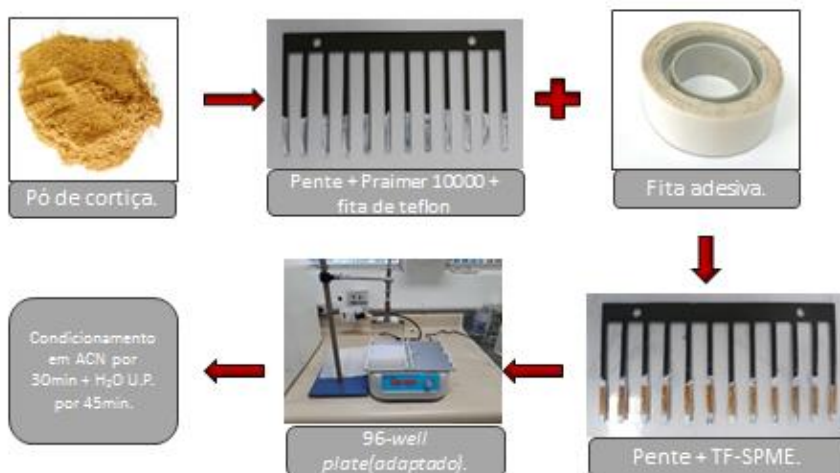
Fonte: Autoria própria

Os pentes em aço inox 435 semelhantes aos do sistema comercial *96-well plate*, foram confeccionados por uma empresa nacional. Em seguida estes foram encaminhados a empresa Praimer revestimentos anti-aderentes Ltda, em Ponta Grossa/PR, para que fosse feito o recobrimento dos mesmos com um polímero (semelhante ao teflon) pela empresa e chamado de Praimer 10000, para que os mesmos resistissem a ação do HCl 6mol L⁻¹ por um período relativamente longo. Após, passou-se fita de teflon nas extremidades para que a fita adesiva pudesse aderir. Mediu-se então 1 cm, a partir da base para cima, em cada um dos pinos presentes nos pentes. A partir do fluxograma apresentado na Figura 15, com uma fita adesiva, colocou-se o pó de cortiça, nessa parte medida, em cada um dos pinos. Por fim, foi realizado o condicionamento para retirada do excesso das partículas e limpeza das mesmas, sendo a primeira etapa feita em 300 µL de acetonitrila por um período de 30 min e a segunda com água ultrapura (300 µL) por um período de 45 min, repetido até que não se observasse

mais partículas de cortiça em suspensão ou no fundo do poço da placa de 96 well plate.

Após um ciclo de extração/dessorção, é necessária uma limpeza do pente para uma análise posterior, visando evitar o efeito memória. Este procedimento foi realizado com 300 μ L de acetonitrila nos poços de dessorção da placa de 96 well plate e sob agitação de 30 min, seguido de 300 μ L de água ultra pura também nos poços de dessorção da placa de 96 well plate e sob agitação por 30 min.

FIGURA 15 – Fluxograma de preparo dos filmes de TF-SPME com cortiça.



Fonte: Autoria própria.

5.5 – Método de preparo da amostra pelo método oficial AOAC 994.12

As amostras após hidrolisadas conforme descrito no item 5.3.1, as ampolas são rompidas e o hidrolisado filtrado em papel filtro de porosidade média. Após pega-se uma alíquota de 1 mL do hidrolisado transfere-se para um frasco de vidro e neutraliza-se com 2 mL de solução neutralizante contendo 10,5 gramas de hidróxido de sódio p.a. dissolvidos em 100 mL de solução tampão de citrato pH 2,2, e faz-se a homogeneização da solução. Filtra-se a solução em filtro de seringa de 0,22 μ m hidrofílico em um frasco de vidro, transfere-se 1 mL do filtrado

para outro frasco de vidro e adiciona-se 3 mL da solução tampão de citrato, pH 2,2 e a solução esta pronta para ser injetada no analisador de aminoácidos.

5.6 – Método de preparo da amostra pelo método proposto

As amostras após hidrolisadas conforme descrito no item 5.3.1, são filtradas em papel filtro de porosidade média. Retira-se uma alíquota de 1 mL do filtrado e insere-se no poço da placa de 96-well plate. Os pente recoberto com o sorvente, são mergulhados nos poços e deixados sob agitação pelo tempo otimizado. Dessorve-se em 250 μ L de tampão citrato de sódio pH 2,2, que é o menor volume de desorvente capaz de cobrir todo a fase extratora, sob agitação pelo tempo otimizado. Após filtra-se em filtro de seringa 0,22 μ m hidrofílico e a amostra está pronta para ser injetada no analisador de aminoácidos.

5.7 Otimizações das variáveis para a análise

5.7.1 Tempo de extração da amostra

Os tempos de extração investigados na amostra sob agitação no sistema 96 well plate foram de 20, 40, 60 e 80 min. O estudo foi realizado em solução padrão dos aminoácidos estudados na concentração de 0,5 μ mol/mL solubilizados em HCl 0,1 mol L⁻¹ e em triplicata. As demais variáveis foram fixadas, tais como a frequência de agitação das placas em 250 rpm, o volume de amostra em 1 mL e o tempo de dessorção em 30 min. O desorvente utilizado foi tampão citrato de sódio pH 2,2.

Os resultados foram expressos em relação ao padrão interno norleucina, conforme preconiza a AOAC 994.12.

5.7.2 Otimização do solvente e tempo de dessorção

Para o procedimento de escolha do solvente de dessorção foi realizado o planejamento de superfície triangular, envolvendo os solventes acetonitrila, metanol e tampão citrato pH 2,2, este último escolhido por ser o veículo do extrato no método oficial AOAC 994.12. Fixou-se 60 min de extração conforme teste descrito acima e 30 min de dessorção. Analisou-se uma situação de compromisso entre os

aminoácidos, sendo ela o número de aminoácidos identificados após a dessorção.

Após a otimização do solvente, otimizou-se o tempo de dessorção. Para isso, fixou-se o tempo de extração de 60 min e o solvente de dessorção tampão citrato pH 2,2. O volume de amostra foi fixado em 1 ml e a frequência de agitação em 250 rpm. Os tempos propostos foram de 10, 20, 30 e 40 min.

5.7.3 Durabilidade dos pentes

Após 15 ciclos, foram produzidos novos pentes e comparado suas capacidades de extração com os usados a fim de averiguar se houve perda no desempenho da fase extratora, e qual foi a intensidade desta perda. Para tal, fez-se um comparativo entre 6 pinos novos e 6 pinos utilizados por 15 ciclos, utilizando a média da razão de área entre o aminoácido e a norleucina.

5.8 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados utilizando condições de extração previamente otimizadas. Para este estudo foi realizada a avaliação da faixa linear, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), R^2 , precisão e exatidão. As curvas analíticas foram feitas pelo método de adição de padrão em amostras de conteúdo ileal de suínos, com alíquotas de soluções padrão contendo concentrações conhecidas dos analitos. O LOD foi estimado como sendo 3 vezes o desvio padrão de 10 determinações independentes, do menor ponto de adição da curva analítica, sem exclusão de zero ou de resultados negativos, e o LOQ como sendo 10 vezes o desvio padrão das mesmas 10 determinações independentes (IUPAC, 2002). A faixa linear foi determinada como sendo o seu limite inferior o limite de quantificação e o limite superior a perda da linearidade pela curva. A exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de recuperação relativa dos analitos em amostras reais de conteúdo ileal de suínos, em dias diferentes, pinos e poços diferentes. A precisão foi determinada pela extração, dessorção e leitura em 3 níveis de fortificação da amostra, com 7 replicatas para cada nível e calculado o desvio padrão relativo (RSD) das leituras para cada nível (IUPAC, 2002).

6- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados testes para verificação da sorção ou não dos aminoácidos pela cortiça. Para os testes utilizou-se em uma solução de padrões dos aminoácidos $0,5 \mu\text{mol mL}^{-1}$ da Sigma Aldrich(Figuras 16) e uma amostra de hidrolisado de conteúdo ileal de suínos(Figura 17). Foram analisados pelo método oficial AOAC 994,12 e pelo método proposto.

FIGURA 16 – Cromatogramas dos analitos estudados, utilizando solução padrão Sigma –Aldrich, analisada pelo método proposto e pelo oficial AOAC 994.12.

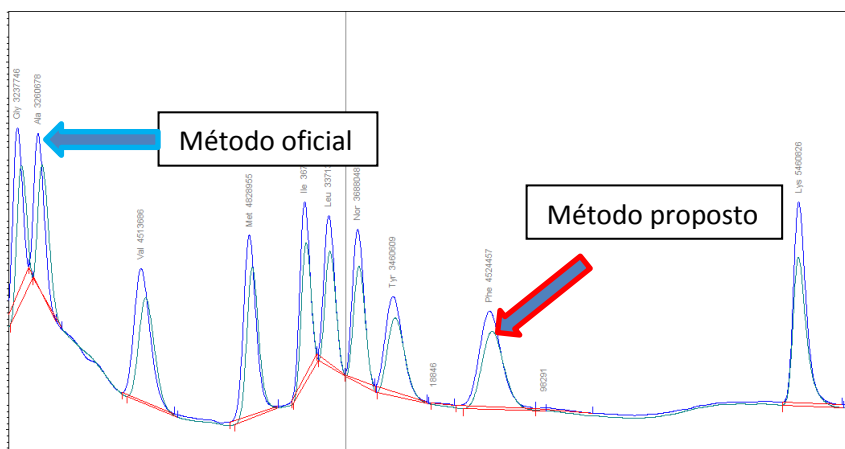
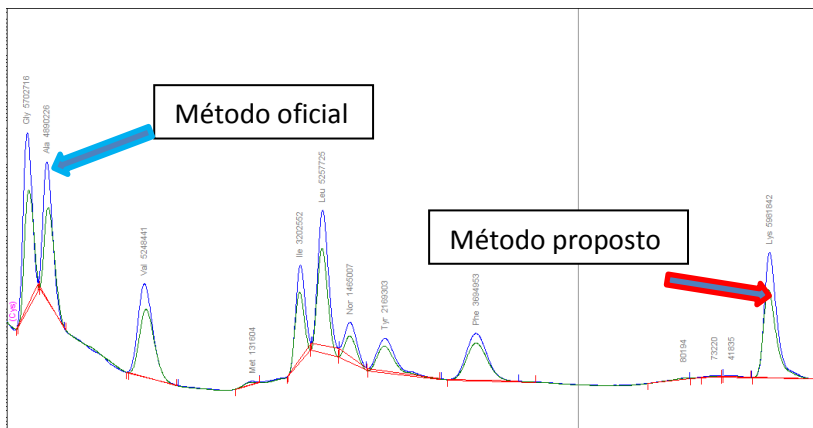


FIGURA 17 – Cromatogramas dos analitos estudados, utilizando amostra de hidrolisado de conteúdo ileal de suínos, analisada pelo método proposto e pelo oficial AOAC 994.12.



Notou-se que a cortiça sorvia e dessorvia os aminoácidos tanto da solução contendo somente os padrões como do hidrolisado de conteúdo ileal, porém com uma área de pico menor. Isso se deve a uma característica da técnica que não é exaustiva, e sim de equilíbrio, ou seja, não sorve todo o analito da amostra e sim forma um equilíbrio entre os analitos sorvidos e os presentes na amostra. Portanto pela menor concentração sorvida e dessorvida na técnica TF-SPME, os picos do cromatograma são menores comparados a metodologia oficial.

6.1 Otimizações da etapa de extração

Conforme visto anteriormente a condição de pH ótimo para a extração não precisou ser ajustado, visto que o hidrolisado proteico se encontra em uma solução HCl 6 mol L^{-1} , cujo pH encontra-se abaixo de 1, próximo dos 2 pontos abaixo do pKa de cada analito, conforme preconiza a técnica de SPME.

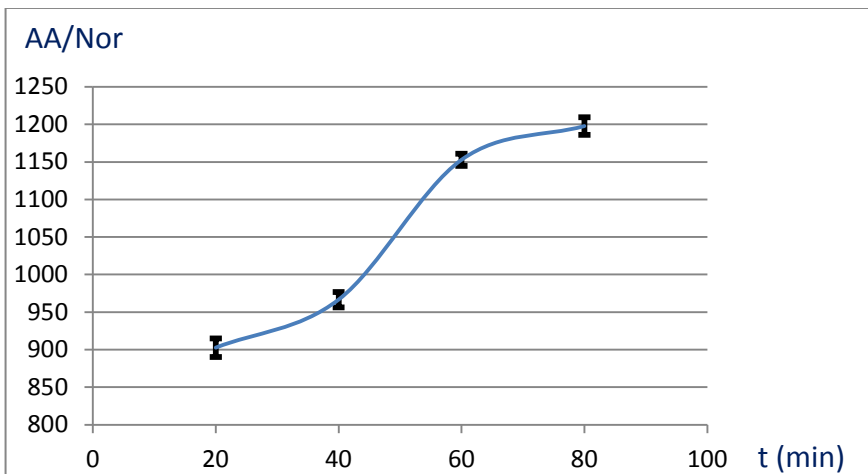
O volume de amostra utilizado nos poços das placas de 96 Well Plate foram fixados em 1 mL, que é o volume suficiente para cobrir a fase extratora e suportar a agitação da placa de 96 poços sem extravasar a amostra. A velocidade de agitação foi fixada em 250 rpm, pois foi a maior velocidade em que as amostras suportaram dentro dos poços sem que houvesse extravasamento, devido a turbulência da agitação.

O volume de dessorção foi fixado em 250 μL , pois foi o menor volume capaz de cobrir toda a fase extratora, assim conseguimos concentrar o sorvido pela cortiça em 4 vezes.

A temperatura de extração foi a temperatura do ambiente climatizado (aproximadamente 21° C) da sala de preparo de amostras para determinação de aminoácidos. As ampolas contendo o hidrolisado são retiradas da geladeira e ficam por 2 horas neste ambiente para estabilizar a temperatura com o meio externo, para depois seguirem os passos de preparo.

Os tempos de testes para extração conforme descrito anteriormente foram de 20,40, 60 e 80 min. e os resultados expressos no Gráfico 01:

GRÁFICO 01 – Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de extração.



Fonte: Autoria Própria.

A situação compromisso utilizada para este teste foi o somatório da razão da área de cada aminoácido pela área do padrão interno norleucina (AA/Nor). Utilizou-se para o teste a solução padrão de aminoácidos da Sigma-Aldrich com concentração de 0,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

Observa-se a formação de um platô entre os tempos de 60 e 80 min, mostrando que a extração está atingindo o seu máximo, portanto

acima de 60 min já não se tem um ganho de área dos somatórios da razão AA/Nor que justifique aumentar o tempo de extração. Sendo assim ficou estabelecido que o tempo ótimo de extração para a técnica é 60 min.

Tempos inferiores a 60 min aparentemente não são o suficiente para que o equilíbrio de distribuição seja atingido e ainda apresentam desvios padrão maiores que para o tempo de 60 min. O uso de tempos menores apesar de trazer uma maior frequência analítica, nesse caso, poderia acarretar em uma menor precisão do método.

6.2 Otimizações da condições de dessorção dos aminoácidos

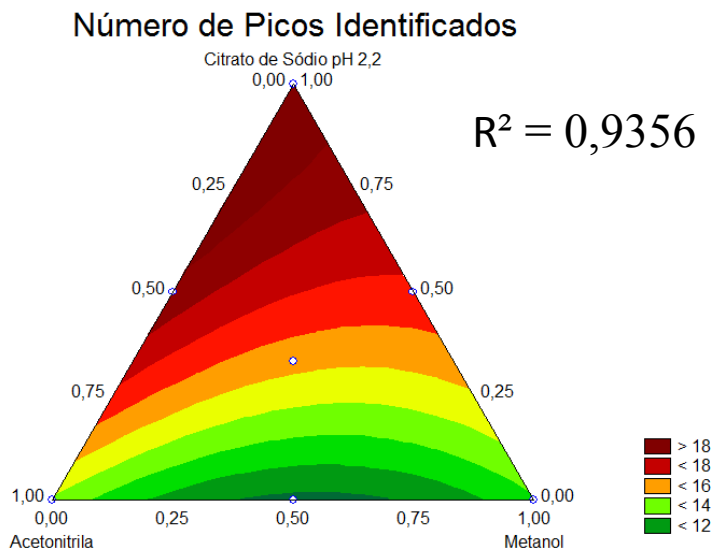
A etapa de dessorção requer algumas otimizações, dentre elas o dessorvente a ser utilizado, foram testados a acetonitrila, o metanol e o tampão citrato de sódio pH 2,2. O solvente que promoveu a melhor extração dos analitos a partir da fase extratora foi o tampão citrato de sódio puro em pH 2,2 no volume de 250 μ L, como é mostrado superfície de resposta abaixo.

TABELA 02 - Planejamento experimental e resposta do simplex-centroid:

Experimento	Tampão citrato de sódio pH2,2	Acetonitrila	Metanol	Número de picos
1	50	50	0	18
2	50	0	50	16
3	33	33	33	17
4	0	100	0	14
5	0	0	100	13
6	100	0	0	20
7	0	50	50	10

Fonte: Autoria própria

FIGURA 18 – Modelo Simplex-centroid para escolha do solvente de dessorção. Neste experimento realizou-se uma extração de 60 min. e uma dessorção de 30 min.



Fonte: Autoria própria.

TABELA 03 – Tabela ANOVA para o modelo Simplex-lattice

ANOVA; Var.:Picos identificados (Spreadsheet2)								
3 Factor mixture design; Mixture total=100,, 7 Runs								
Sequential fit of models of increasing complexity								
Model	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Linear	55,09864	2	27,54932	12,61565	4	3,153912	8,734968	0,034710
Total Adjusted	67,71429	6	11,28571					

Fonte: Print screen tela do software Statistica 7

Para esta otimização utilizou-se a solução padrão de aminoácidos da Sigma-Aldrich com concentração de $0,5 \mu\text{mol mL}^{-1}$, e como situação compromisso os números de picos identificados após a dessorção, esses picos são referentes aos aminoácidos identificados.

Pelo modelo simplex-simploid pode-se observar que o dessorvente tampão citrato de sódio pH 2,2 puro foi o que obteve uma melhor resposta, indicado pela coloração vermelha mais intensa.

Através da análise da ANOVA pode-se extrair que o p foi menor que o nível de significância estabelecido de 0,05, já o F calculado foi superior ao F tabelado, o que também é significativo. Estes 2 itens da ANOVA foram significativos, Isto significa dizer que a alteração do solvente de extração altera a resposta.

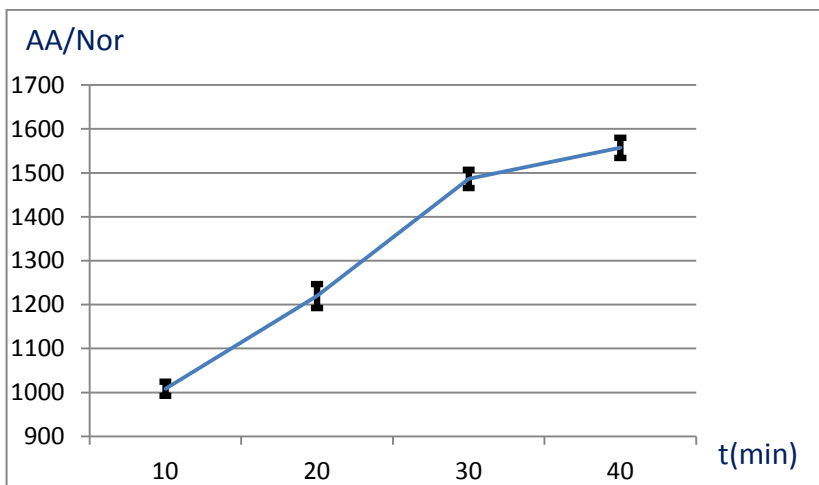
O R^2 representa a proporção de variação explicada pelo modelo, considerando que o valor do R^2 foi de 0,9356 e quanto mais próximo de 1 melhor explica.

A seleção do tampão citrato pH 2,2 como melhor dessorverte é muito importante, pois é utilizado como diluente da amostras em caso de necessidade, e o pH 2,2 é o pH da solução a ser injetada no equipamento, conforme metodologia AOAC 994.12, não havendo portanto a necessidade de ajustes de pH na solução dessorvida. Desta forma, após filtração com filtro de seringa de 0,22 μm , a solução pode ser injetada no equipamento.

Isto reduz os custos com a neutralização da amostra e com ajuste de pH, que geram um uso 16 vezes maior de tampão citrato de sódio pH 2,2, além de eliminação de 2 passos da técnica oficial (descrito anteriormente). Esta diminuição do uso de tampão citrato de sódio pH 2,2 esta próxima de 5 mL por análise, considerando que as amostras são analisadas em duplicatas essa redução chegaria próximo a 10 mL de resíduos por amostra, o que pode representar uma diminuição de 1 L de tampão citrato de sódio pH 2,2 por dia no preparo das amostras. Reduzindo assim os custos da determinação que são muito altos.

Após a otimização do solvente, otimizou-se o tempo de dessorção, fixou-se o tempo de extração de 60 min e o dissolvente tampão citrato pH 2,2. Os tempos propostos foram de 10, 20, 30 e 40 min, os testes foram feitos em triplicata e os resultados expressos no gráfico 02.

GRAFICO 02 – Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de dessorção.



Fonte: Autoria Própria.

A situação compromisso utilizada para este teste foi o somatório da razão da área de cada aminoácido pela área do padrão interno norleucina (AA/Nor). Utilizou-se para o teste a solução padrão de aminoácidos da Sigma-Aldrich com concentração de $0,5 \mu\text{mol mL}^{-1}$.

Observa-se pelo gráfico que há a formação de um platô entre os tempos 30 e 40 min, mostrando que a dessorção está próxima do equilíbrio, portanto acima de 30 min já não se tem um ganho de razão AA/Nor que justifique aumentar o tempo de dessorção. Sendo assim, ficou estabelecido que o tempo ótimo de dessorção para a técnica é 30 min.

A utilização de tempos de dessorção inferiores a 30 min apesar de trazer uma maior frequência analítica, nesse caso, poderia acarretar em uma menor precisão do método, devido aos desvios padrões são maiores em tempos menores.

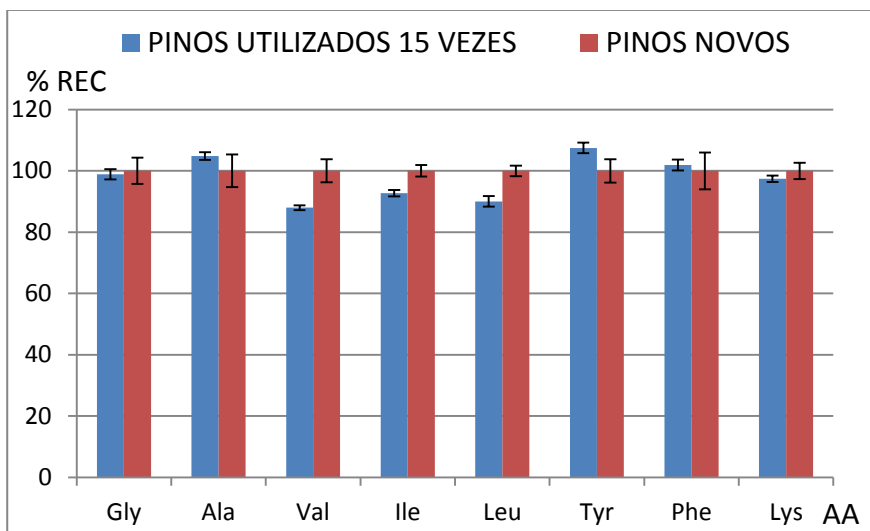
6.3 Estabilidade da cortiça como fase extratora

Na maioria das técnicas de preparo de amostras, a fase extratora entra em contato com a amostra e com o solvente de dessorção, por inúmeras vezes, e estes sucessivos ciclos podem levar a uma perda na

sua eficiência. Deste modo é necessário que a fase extratora possua elevada estabilidade para que possa ser reutilizada várias vezes sem alterar sua performance.

Após a realização de diversos testes para a otimização do método, um pente que totalizou 15 ciclos de análise foi testado comparativamente a um pente recém confeccionado. Foi comparado o percentual de recuperação dos pinos que já haviam completados 15 ciclos com os pinos novos, e os resultados expressos no Gráfico 03.

GRÁFICO 03 - Comparativo entre pente com 15 ciclos realizados, com recém confeccionados. Para este experimento se utilizou um pente com seis pinos novos e seis usados sob condições ótimas do ciclo de análise.



Fonte: Autoria própria.

Através do gráfico de barras acima, observa-se que a cortiça começa a ter uma pequena perda, porém não significativa na eficiência. A eficiência de extração dos pinos usados variou de 87,98% para a valina até 107% para a tirosina, em comparação aos novos. Isto pode acontecer devido a complexidade da amostra. Embora este percentual de recuperação para alguns aminoácidos pareçam baixos, eles ainda estão

dentro do preconizado pela IUPAC, 2002 e na prática ela é aceitável, uma vez que os resultados são expressos em percentual na amostra.

Não foram realizados mais testes de perda de eficiência após os 15 ciclos pois se percebeu que alguns pentes começaram a soltar a fita dupla face do pente, podendo assim causar alguma perda de eficiência e ela ser mascarada por uma média de valores de pinos distintos.

6.4 Parâmetros de mérito do método proposto

Os parâmetros analíticos de mérito previamente citados na seção experimental foram determinados com a utilização do modo TF-SPME em sistema 96 Well Plate utilizando a cortiça como fase extratora. Para a avaliação dos parâmetros de mérito, amostras de conteúdo ileal suíno foram fortificadas com concentrações conhecidas de cada aminoácido estudado e as análises foram realizadas em triplicata. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 04.

TABELA 04- Valores obtidos para LOD, LOQ, faixa linear e coeficiente de determinação para o método proposto, para determinação de aminoácidos em amostras de conteúdo ileal.

Aminoácido	Faixa Linear ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	R ²	LOD ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
Glicina	0,15 - 2,21	0,968	0,04	0,15
Alanina	0,16 - 1,57	0,969	0,05	0,16
Valina	0,29 - 1,60	0,988	0,09	0,29
Isoleucina	0,13 - 1,24	0,999	0,04	0,13
Leucina	0,14 - 1,66	0,999	0,04	0,14
Tirosina	0,21 - 1,14	0,993	0,06	0,21
Fenilalanina	0,12 - 1,12	0,988	0,04	0,12
Lisina	0,18 - 1,44	0,996	0,05	0,18

Fonte: A autoria própria.

Os parâmetros de mérito foram assim estabelecidos, LOD como sendo 3 vezes o desvio padrão de 10 determinações do primeiro ponto da curva, o LOQ como sendo 10 vezes este desvio padrão, a faixa linear foi estabelecida como sendo o limite inferior o LOQ e o limite superior

o último ponto da curva em que ela se comporta linearmente e o R^2 foi calculado pelo software Origin 8.

Como se pode observar na tabela 3, uma boa faixa linear foi alcançada através do método proposto, ficando dentro da faixa de trabalho, como veremos a frente nas determinações realizadas em amostras reais. Foram obtidos coeficientes de determinação que variaram de 0,968 para glicina a 0,999 para isoleucina e leucina, indicando, que os modelos conseguem explicar quase a totalidade dos valores observados. Os limites de detecção, quantificação estão dentro do aceitável para o método, pois na hidrólise das amostras é pesada uma quantidade de proteína (20 mg), que faz com que as concentrações dos aminoácidos estejam em uma concentração mínima, e possam ser quantificadas.

Para avaliação da precisão do método foram analisados três níveis de fortificação da amostra com 7 replicatas para cada nível, e repetida com uma diferença de 10 dias, com pentes diferentes, sendo que o pente utilizado no ensaio intradia estava sendo reutilizado pela terceira vez enquanto que o pente do ensaio interdía estava sendo reutilizado pela sexta vez, através destes dados foi possível calcular o desvio padrão relativo (RSD) para cada nível de fortificação e em diferentes dias e seus resultados estão expressos na Tabela 05 abaixo.

TABELA 05 – Teste de repetibilidade em amostra de conteúdo ileal, em três níveis de fortificação.(n=7)

Aminoácido	Intradia			Interdia		
	RSD 0,25 $\mu\text{mol mL}^{-1}$	RSD 0,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$	RSD 0,75 $\mu\text{mol mL}^{-1}$	RSD 0,25 $\mu\text{mol mL}^{-1}$	RSD 0,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$	RSD 0,75 $\mu\text{mol mL}^{-1}$
Glicina	2,04	1,65	2,85	4,37	6,31	6,83
Alanina	1,86	1,24	2,74	6,57	8,42	8,5
Valina	1,9	0,79	3,43	3,74	1,94	4,52
Isoleucina	1,91	1,05	3,23	1,89	4,13	6,25
Leucina	1,65	1,7	3,17	1,72	2,69	5
Tirosina	2,1	1,73	2,69	3,96	5,93	8,68
Fenilalanina	5,53	1,78	3,59	6,37	9,50	7,57
Lisina	1,9	1,08	4,66	2,66	2,65	5,32

Fonte: Autoria própria.

Como podemos observar na Tabela 05 acima os valores de RSD variaram de 0,79% para a valina no nível de fortificação médio até 9,50% para a fenilalanina no nível de fortificação médio. Como descrito anteriormente os valores de RSD que representam uma boa precisão, muito abaixo do que preconiza a literatura que é de até 20% (SANCO, 2013), então podemos afirmar que o método é preciso.

Para análise da exatidão do método, foi avaliado a recuperação dos analitos relativamente aos valores obtidos na curva analítica. A curva foi realizada em amostras de conteúdo ileal com adição de padrões com concentrações conhecidas dos aminoácidos. O procedimento foi realizado em datas diferentes (com uma diferença de 10 dias uma da outra), com pentes diferentes (o primeiro com reutilização por 5 ciclos e o segundo com reutilização por 9 ciclos) e em poços com diferentes localizações na placa. O resultado é mostrado na Tabela 06 abaixo.

TABELA 06 - Recuperação relativa em amostra de digesta suína, em três níveis de fortificação.

Aminoácido	Interdia			Intradia		
	Rec. relativa no menor nível (%)	Rec. relativa no nível médio (%)	Rec. relativa no maior nível (%)	Rec. relativa no menor nível (%)	Rec. relativa no nível médio (%)	Rec. relativa no maior nível (%)
Glicina	99,88 ± 4,36	98,02 ± 6,18	102,43 ± 3,90	96,93 ± 1,97	95,76 ± 2,73	93,49 ± 1,55
Alanina	99,08 ± 6,51	96,15 ± 8,10	103,67 ± 5,14	96,29 ± 1,79	97,46 ± 2,67	96,98 ± 1,21
Valina	99,17 ± 3,71	97,68 ± 1,89	96,31 ± 3,68	105,27 ± 2,01	92,18 ± 3,16	87,70 ± 0,69
Isoleucina	100,04 ± 1,89	101,89 ± 4,21	99,91 ± 2,60	95,86 ± 1,83	90,56 ± 2,92	87,52 ± 0,92
Leucina	98,87 ± 1,70	99,58 ± 2,67	101,03 ± 2,88	99,30 ± 1,63	91,63 ± 2,91	87,03 ± 1,48
Tirosina	97,78 ± 3,88	100,50 ± 5,96	101,98 ± 3,55	87,83 ± 1,85	97,76 ± 2,63	99,75 ± 1,72
Fenilalanina	100,14 ± 6,38	99,09 ± 2,65	99,69 ± 5,26	96,80 ± 5,35	101,42 ± 3,64	99,88 ± 1,78
Lisina	100,71 ± 2,68	101,99 ± 2,70	100,93 ± 4,63	98,47 ± 1,87	96,00 ± 4,47	95,32 ± 1,03

Fonte: Autoria própria.

O método teve uma recuperação que variou de 87,03% para a leucina no menor nível de fortificação a 105,27% para a valina no maior nível de fortificação. Os resultados obtidos mostram que o método apresenta boa exatidão e está dentro do aceitável, conforme já descrito anteriormente, onde valores de recuperação variam entre 80 e 120% (IUPAC, 2002).

6.5 Determinação de aminoácidos em amostras reais aplicando o método proposto e o oficial.

Foram analisadas em duplicata 12 amostras reais de conteúdo ileal de suínos oriundas de um projeto desenvolvido pela Embrapa Suínos e Aves para estudos de metabolismo avaliando desempenho e digestibilidade de matéria prima. As amostras foram pesadas e hidrolisadas conforme descrito anteriormente e analisadas pelos dois métodos, o oficial da AOAC e o proposto pelo estudo, os resultados estão expressos nas TABELAS 07 e 08 abaixo.

TABELA 7 - Concentração de aminoácidos nas amostras reais analisadas pelo método AOAC 994.12

	Gli	Ala	Val	Ile	Leu	Try	Phe	Lys
Amostra 1	1,110	1,231	0,711	0,514	0,945	0,338	0,361	0,399
Amostra 2	0,978	1,189	0,632	0,459	0,822	0,321	0,326	0,357
Amostra 3	1,068	0,950	0,603	0,415	0,713	0,279	0,293	0,425
Amostra 4	1,135	1,184	0,681	0,460	0,900	0,300	0,330	0,285
Amostra 5	1,124	0,984	0,652	0,455	0,762	0,280	0,321	0,462
Amostra 6	1,056	0,671	0,524	0,353	0,546	0,330	0,249	0,395
Amostra 7	1,285	1,173	0,748	0,518	0,994	0,365	0,372	0,378
Amostra 8	1,099	1,399	0,756	0,512	1,162	0,372	0,406	0,355
Amostra 9	1,156	1,007	0,655	0,459	0,865	0,375	0,343	0,428
Amostra 10	1,522	1,070	0,807	0,577	1,081	0,325	0,418	0,634
Amostra 11	1,308	0,816	0,654	0,449	0,789	0,178	0,329	0,510
Amostra 12	0,983	0,801	0,677	0,489	0,805	0,286	0,363	0,474

*Valores expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$

Fonte: Autoria própria.

TABELA 08 – Concentração de aminoácidos nas amostras reais analisadas pelo método proposto aplicando a técnica de TF-SPME.

	Gli	Ala	Val	Ile	Leu	Try	Phe	Lys
Amostra 1	0,953	0,729	0,714	0,452	0,990	0,314	0,400	0,553
Amostra 2	0,947	0,755	0,723	0,444	0,984	0,289	0,414	0,559
Amostra 3	0,964	0,703	0,668	0,409	0,877	0,238	0,386	0,507
Amostra 4	1,003	0,664	0,684	0,395	0,890	0,262	0,380	0,383
Amostra 5	1,014	0,665	0,700	0,411	0,901	0,271	0,385	0,469
Amostra 6	0,947	0,472	0,611	0,352	0,718	0,271	0,384	0,475
Amostra 7	1,261	0,810	0,851	0,542	1,172	0,396	0,470	0,556
Amostra 8	1,046	0,948	0,835	0,527	1,337	0,410	0,521	0,445
Amostra 9	1,103	0,668	0,724	0,471	0,995	0,403	0,432	0,472
Amostra 10	1,470	0,703	0,873	0,584	1,230	0,347	0,506	0,715
Amostra 11	1,349	0,591	0,722	0,473	0,944	0,225	0,411	0,597
Amostra 12	0,993	0,572	0,713	0,488	0,911	0,214	0,419	0,530

*Valores expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$

Fonte: Autoria própria.

Conforme a Tabela 08 acima pode-se observar que as concentrações de aminoácidos nas amostras analisadas encontram-se dentro da faixa linear do método proposto, para cada aminoácido.

Foi realizado entre os resultados obtidos pelos dois métodos o teste T pareado, para análise de diferenças estatísticas entre elas, e os resultados expressos na Tabela 09 e 10:

TABELA 09 – Resultados dos testes T pareados, entre as determinações de aminoácidos estudados pelo método oficial e pelo método proposto.

Aminoácidos	Tcalculado	Tcrítico
Gli	0,96	2,07
Ala	5,01	
Val	-1,91	
Ile	0,37	
Leu	-1,89	
Try	0,35	
Phe	-4,29	
Lys	-2,71	

Fonte: Autoria própria.

TABELA 10 – Resultados dos testes T pareados, entre as amostras pelo método oficial e pelo método proposto.

Amostras	Tcalculado	Tcrítico
Amostra 1	0,41	2,14
Amostra 2	-0,03	
Amostra 3	-0,005	
Amostra 4	0,47	
Amostra 5	0,19	
Amostra 6	-0,11	
Amostra 7	-0,16	
Amostra 8	-0,005	
Amostra 9	0,017	
Amostra 10	0,004	
Amostra 11	-0,2	
Amostra 12	0,04	

Fonte: Autoria própria.

Analisando a tabela 9, comparando o Tcalculado de cada aminoácido com o Tcrítico, pode-se perceber que para três aminoácidos (alanina, fenilalanina e lisina) o teste foi significativo, ou seja, as respostas são diferentes entre os métodos. Porém quando analisa-se a tabela 10, comparando o Tcalculado de cada amostra com o Tcrítico, observa-se que o teste T não é significativo para nenhuma amostra. Levando-se em conta que os analitos saem em uma resposta única, (único cromatograma), entende-se que o melhor meio de se avaliar as respostas é através da composição total de aminoácidos na amostra e não por aminoácido separadamente. Sendo assim podemos afirmar que não há diferença significativa entre o método proposto e o método oficial,

Também foi realizado o cálculo do intervalo de confiança de 95% para as amostra e expresso na Tabela 11.

TABELA 11 - Comparação das amostras entre os métodos proposto (MP) e o método oficial(MO), levando-se em conta o Intervalo de confiança(IC) 95%. (n=2)

	Gr-MP	Gr-MO	Ala-MP	Ala-MO	Val-MP	Val-MO	Ile-MP	Ile-MO	Leu-MP	Leu-MO	Tyr-MP	Tyr-MO	Phe-MP	Phe-MO	Lyf-MP	Lyf-MO
Am1	0,953 ±0,330	1,110 ±0,351	0,729 ±0,348	1,231 ±0,315	0,714 ±0,238	0,711 ±0,195	0,452 ±0,110	0,514 ±0,161	0,990 ±0,289	0,946 ±0,281	0,314 ±0,110	0,338 ±0,116	0,400 ±0,147	0,361 ±0,112	0,553 ±0,268	0,400 ±0,143
Am2	0,947 ±0,322	0,978 ±0,025	0,755 ±0,276	1,039 ±0,231	0,723 ±0,200	0,633 ±0,016	0,444 ±0,083	0,460 ±0,018	0,984 ±0,256	0,822 ±0,119	0,289 ±0,121	0,321 ±0,053	0,414 ±0,013	0,326 ±0,021	0,559 ±0,210	0,357 ±0,014
Am3	0,964 ±0,315	1,088 ±0,118	0,703 ±0,344	0,951 ±0,045	0,683 ±0,236	0,814 ±0,019	0,409 ±0,101	0,416 ±0,013	0,871 ±0,200	0,753 ±0,080	0,270 ±0,085	0,279 ±0,049	0,386 ±0,180	0,293 ±0,025	0,507 ±0,266	0,425 ±0,009
Am4	1,003 ±0,080	1,135 ±0,135	0,664 ±0,327	1,184 ±0,207	0,684 ±0,223	0,631 ±0,109	0,395 ±0,095	0,461 ±0,072	0,890 ±0,242	0,900 ±0,280	0,262 ±0,058	0,300 ±0,023	0,380 ±0,185	0,331 ±0,061	0,383 ±0,171	0,288 ±0,026
Am5	1,014 ±0,159	1,124 ±0,175	0,665 ±0,306	0,985 ±0,180	0,700 ±0,217	0,652 ±0,125	0,411 ±0,061	0,456 ±0,091	0,911 ±0,131	0,762 ±0,160	0,271 ±0,102	0,280 ±0,089	0,385 ±0,045	0,321 ±0,089	0,469 ±0,103	0,462 ±0,088
Am6	0,947 ±0,285	1,056 ±0,024	0,472 ±0,289	0,672 ±0,100	0,611 ±0,240	0,525 ±0,033	0,332 ±0,090	0,353 ±0,009	0,718 ±0,118	0,546 ±0,048	0,271 ±0,137	0,330 ±0,022	0,394 ±0,159	0,249 ±0,028	0,475 ±0,166	0,395 ±0,012
Am7	1,261 ±0,276	1,285 ±0,006	0,810 ±0,280	1,174 ±0,100	0,851 ±0,230	0,748 ±0,053	0,542 ±0,182	0,518 ±0,011	1,172 ±0,353	0,994 ±0,216	0,396 ±0,178	0,365 ±0,052	0,470 ±0,089	0,373 ±0,025	0,556 ±0,180	0,378 ±0,003
Am8	1,046 ±0,060	1,089 ±0,024	0,948 ±0,279	1,399 ±0,128	0,635 ±0,082	0,756 ±0,026	0,527 ±0,058	0,513 ±0,043	1,337 ±0,054	1,163 ±0,064	0,410 ±0,074	0,372 ±0,044	0,521 ±0,049	0,406 ±0,051	0,445 ±0,057	0,356 ±0,040
Am9	1,103 ±0,247	1,156 ±0,164	0,668 ±0,252	1,007 ±0,224	0,724 ±0,127	0,656 ±0,049	0,471 ±0,045	0,459 ±0,047	0,995 ±0,230	0,866 ±0,190	0,403 ±0,181	0,376 ±0,010	0,431 ±0,138	0,344 ±0,025	0,472 ±0,019	0,429 ±0,027
Am10	1,470 ±0,098	1,522 ±0,020	0,703 ±0,259	1,070 ±0,152	0,673 ±0,097	0,808 ±0,012	0,594 ±0,007	0,578 ±0,016	1,291 ±0,131	1,082 ±0,084	0,347 ±0,128	0,326 ±0,011	0,506 ±0,111	0,418 ±0,028	0,715 ±0,108	0,653 ±0,085
Am11	1,349 ±0,150	1,308 ±0,058	0,591 ±0,156	0,817 ±0,101	0,722 ±0,084	0,655 ±0,034	0,473 ±0,031	0,450 ±0,017	0,944 ±0,131	0,789 ±0,011	0,166 ±0,021	0,178 ±0,030	0,411 ±0,016	0,329 ±0,012	0,597 ±0,016	0,511 ±0,023
Am12	0,993 ±0,088	0,983 ±0,265	0,572 ±0,279	0,801 ±0,174	0,713 ±0,105	0,677 ±0,010	0,488 ±0,002	0,489 ±0,038	0,911 ±0,002	0,806 ±0,018	0,214 ±0,084	0,286 ±0,032	0,419 ±0,056	0,364 ±0,023	0,530 ±0,068	0,474 ±0,029

Fonte: Autoria própria.

Valores expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$

De acordo com a Tabela 11, onde mostra os valores determinados para cada aminoácido pelos dois métodos e seus respectivos intervalos de confiança, pode-se concluir que os valores correspondentes aos aminoácidos pelos dois métodos são equivalentes.

Também foram comparadas as curvas adquiridas pelo método oficial AOAC 994.12 e o método proposto. As curvas foram feitas em amostras reais com adição de padrão e em triplicata. Foram comparadas as equações das curvas de calibração pelos dois métodos nas amostras fortificadas pelo software Origin 8, conforme a Tabela 12.

TABELA 12- Comparação entre as equações das curvas de calibração do método oficial e do método proposto.

Aminoácido	Método Proposto	R2	Método Oficial	R2
Alanina	$y = 3,1709x$	0,9999	$y = 3,5873x$	0,9866
Fenilalanina	$y = 3,887x$	0,9968	$y = 3,8114x$	0,9969
Glicina	$y = 3,0005x$	0,9996	$y = 3,4669x$	0,9752
Isoleucina	$y = 2,6154x$	0,9948	$y = 2,634x$	0,9944
Leucina	$y = 3,0286x$	0,9888	$y = 3,2929x$	0,9786
Lisina	$y = 4,7113x$	0,9902	$y = 4,9387x$	0,9944
Tirosina	$y = 3,2145x$	0,9935	$y = 3,3694x$	0,9987
Valina	$y = 3,5549x$	0,9925	$y = 3,5294x$	0,9946

Fonte: Autoria própria.

Observando a Tabela 11 pode-se comparar os coeficientes de determinação, onde para os aminoácidos alanina, glicina e leucina ele é ligeiramente superior no método proposto do que no método oficial, enquanto que para os outros aminoácidos ele é muito próximo.

Também foram realizados ensaios comparativos dos parâmetros de mérito entre o método oficial e o método proposto, e os resultados expressos na Tabela 13.

TABELA 13 – Comparação de parâmetros de mérito entre o método proposto e o método oficial.

Aminoácido	LOD - MP	LOD - MO	LOQ -MP	LOQ- MO	FAIXA LINEAR- MP	FAIXA LINEAR- MO
Glicina	0,045	0,025	0,148	0,082	0,148 - 2,213	0,08 - 1,836
Alanina	0,049	0,007	0,164	0,023	0,164 - 1,569	0,02 - 1,363
Valina	0,087	0,016	0,289	0,053	0,289 - 1,600	0,05 - 1,595
Isoleucina	0,040	0,004	0,132	0,014	0,132 - 1,240	0,01 - 1,384
Leucina	0,042	0,009	0,140	0,030	0,140 - 1,657	0,03 - 1,477
Tirosina	0,063	0,009	0,210	0,029	0,210 - 1,144	0,02 - 1,031
Fenilalanina	0,036	0,012	0,118	0,039	0,118 - 1,120	0,03 - 1,041
Lisina	0,055	0,024	0,184	0,081	0,184 - 1,437	0,08 - 1,280

*MP – Método Proposto; MO – Método Oficial

*Valores expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que o método oficial apresenta limites de detecção e quantificação menores que o método proposto, devido ao método proposto não ser um método exaustivo e sim de equilíbrio, mesmo concentrando a amostra 4 vezes não se consegue a mesma concentração do método oficial. Porém os limites de detecção e quantificação do método proposto são aceitáveis conforme descrito anteriormente. O método proposto tem uma faixa linear mais ampla, consequentemente uma faixa de trabalho também maior. Para efeitos de análise laboratorial de rotina em conteúdo ileal de suínos, o limite de detecção menor não é o primordial, haja visto que as amostras são pesadas para se ter um mínimo de aminoácidos quantificáveis (como visto na Tabela 06), embora haja um pequeno ganho na amplitude da faixa linear, o maior ganho do método proposto está na maior frequência analítica, além da diminuição do uso de consumíveis, menor geração de resíduos, diminuição de etapas de preparo da amostra e consequentemente diminuição dos custos da análise.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Desenvolveu-se um método de extração simultânea de oito aminoácidos convencionais (glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, valina, treonina, fenilalanina e lisina) em amostras de conteúdo ileal de suínos.

A utilização da técnica TF-SPME associado ao sistema 96-well plate trouxe uma diminuição do tempo de preparo de um conjunto de 96 amostras de 8 para 4 hrs, dobrando a frequência analítica em relação ao método oficial.

A utilização do 96-well plate automatiza todo o processo de extração, o que é um facilitador para análises de rotina, diminui os passos do preparo, bem como o uso de reagente como o tampão citrato de sódio que teve seu consumo reduzido em 95% na etapa de preparo da amostra, diminuindo o custo da análise.

O método também possui outras vantagens como o de utilizar uma fase extratora de baixo custo, fácil acesso e biodegradável, que se mostrou relativamente estável e eficaz durante a execução do trabalho, simplicidade na confecção dos pentes, pequeno volume de amostra e uma boa reprodutibilidade entre os poços, constatada através dos valores de RSD inferiores a 10 % durante a etapa de otimização e validação do método. O método também apresenta uma boa exatidão, com valores de recuperação adequados.

Foi possível obter valores satisfatórios em todos os parâmetros de mérito. A faixa linear para o método proposto possui uma amplitude maior que a do método oficial, muito embora tenha-se encontrado limites de detecção e quantificação maiores, porém aceitáveis para a análise.

Como perspectivas futuras existe a possibilidade de determinação de outros aminoácidos que não fizeram parte deste estudo. Já que o método se mostrou promissor e vantajoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2017**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017> Acesso em: 05 jan. 2018.
- ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J. M. F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 17–26, 2014.
- ARAÚJO, L. F. et al. Proteína bruta e proteína ideal para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 157-162, 2001
- ARAÚJO, W. A. G., et al. Fundamentos e métodos para análise de aminoácidos. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.4, n°2, p.395-404, 2007.
- AUGUSTO, F.; CARASEK, E.; SILVA, R.G.C.; TIVELLINO, S.R. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2533-2543, 2010
- BEZERRA, M. A.; et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.
- BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C., Eds. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**: LTCed. 2015.
- BOYACI, E., GORYŃSKI, K., VITERI, C. R., PAWLISZYN, J. A study of thin film solid phase microextraction methods for analysis of fluorinated benzoic acids in seawater. **Journal of Chromatography A**, 2016. Vol. 1436, p. 51-58.
- BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction. **Analytical Chemistry**, v.75, p.1002-1010, 2003.
- CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. *Bioquímica: Bioquímica Básica*. 5ª Edição, São Paulo: Thomson Learning, 2007.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2015/2016 de área plantada, produtividade e produção**: milho e soja. Brasília, 2015.
- COSTA, F. G. P.; GOULART, C. C. Exigências de aminoácidos para frangos de corte e poedeiras. II Workshop de Nutrição de Aves. Anais. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2010.
- COSTA, F. P. et al. Aminoácidos na nutrição de frangos de corte. www.lisina.com.br, 2012.

ÇABUK, H. et al. A simple solvent collection technique for a dispersive liquid–liquid microextraction of parabens from aqueous samples using low-density organic solvent. *Journal Separation Science*, v. 35, p. 2645-2652, 2012.

DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 157, p. 220-229, 2008.

DIAS, A. N. Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva. 2015. 151 f. **Tese (Doutorado em Química)**. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DIAS, A. N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2013. Vol. 772, p. 33-39.

DIAS, A. N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 20 nov. 2014. Vol. 134, p. 409-414.

DIAS, A. N., SILVA, A. C., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 2015. Vol. 888, p. 59-66.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Central de Inteligência de Suínos e Aves. ICPSuíno/Embrapa. 2016. Disponível em www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/custo/icpsuino. Acesso em 06 dez 2017.

EUROPEAN COMMISSION: HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. SANCO/12571/ 2013: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Belgium, 2013. 44p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf >. Acesso em: 12 dez. 2017.

FAO 2003. World agriculture: Towards 2015/2030. An FAO perspective. . In Food and Agriculture Organization of the United Nations Earthscan Publications Ltda, Londres.

FERNANDES, E. M., CORRELO, V. M., MANO, J. F., REIS, R. L. Cork–polymer biocomposites: Mechanical, structural and thermal properties. *Materials and Design*, 21 may 2015. Vol. 82, p. 282-289.

HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008.

HENRIQUEZ, Horacio. **Bioquímica - Aminoácidos**. Disponível em <http://irasx.blogspot.com.br/2016/06/bioquimica.html> Acesso em 30 de janeiro de 2018.

HOSTAGNO, H. O. Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para e suínos. *R. Bras. Zootec.*, v.36, suplemento especial, p.295-304, 2007.

HTOO, J., WILTAFSKY, M. K. Roles, metabolism y antagonismos de aminoácidos de cadena ramificada en la nutrición animal. *AminoNews*, v. 16, n. 1, p. 25-32, 2011.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, No. 5, p. 835–855, 2002.

JIANG, R.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. **Trac-Trend Anal. Chem.** v. 39, p. 245-253, 2012.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 35-62, 2000

KIM, S. W.; MATEO, R. D.; YIN, Y. L.; WU, G. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, Seoul, v. 20, n. 2, p. 295-306, 2007

KOKOSA, J. M. et al. **Solvent Microextraction. Theory and Practice**. 1. ed. Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, Inc., 2009. 323 p.

KOMATSU, J.M. Vaz, Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida, *Quím. Nova* 27 (5) (2004) 720–724.

KRABBE, E. L. . A já consagrada fitase:uma visão sob outro ângulo. *Avicultura Industrial* (Porto Feliz. Impreso), Brasil, p. 12 - 21, 01 maio 2012.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. *Bioquímica Básica*. 3ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia chromatographica**. v.5, n.3, p.249-262, 2013

- MIRNAGHI, F. S., MOUSAVI, F., ROCHA, S. M., PAWLISZYN, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. Vol. 1276, p. 12-19
- MIRNAGHI, F. S., MONTON, M. R. N., PAWLISZYN, J. Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines. **Journal of Chromatography A**, 2012. Vol. 1246, p. 2-8.
- MOHAMMADI, A.; YAMINI, Y.; ALIZADEH, N. Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, n. 1-2, p. 1-8, 2005.
- MORÉS, L.; DIAS, A.N.; CARASEK, E. Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river. **Journal of separation Science**, 2017.
- MORÉS, L. **Cortiça como fase extratora para a técnica de tf-spme em sistema de 96-well plate para a extração de contaminantes emergentes de amostras de água**. 2016. 59 f. TCC (Bacharelado em Química). Curso de Química – Bacharelado da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MOUSAVI, F; PAWLISZYN, J.; Silica-based ionic liquid coating for 96-blade system for extraction of aminoacids from complex matrixes. *Analytica Chimica Acta* 803 (2013) 66–74.
- NOGUERO, E. et al. Nutrição de aminoácidos para leitões: uma visão da indústria. www.lisina.com.br, 2012.
- NOGUEIRA, E., KUTSCHENKO M., LUCIANO S., ISHIKAWA E., LIMA, L. **Nutrição de Aminoácidos para Leitões: Uma Visão Da Indústria** (2012). Disponível no site www.lisina.com.br, acessado em 17 dez de 2017.
- OLIVELLA, M. À., FERNÁNDEZ, I., CANO, L. JOVÉ, P., OLIVERAS, A. Role of chemical components of cork on sorption of aqueous polycyclic aromatic hydrocarbons. **International Journal of Environmental Research**, 2 aug. 2012. Vol. 7, p. 225-234.
- OUYANG, G., PAWLISZYN, J. Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 692-703, 2006.

OUYANG, G., PAWLISZYN, J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v.627, p. 184–197, 2008.

PAWLISZYN, J., Handbook of Solid Phase Microextraction, Chemical Industry Press, Ontario, 2009, 410 p.

PAWLISZYN, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Elsevier, 2012. 478 p.

PARSONS, C. M., BAKER, D. H., 1994. The concept and use of ideal proteins in the feeding of nonruminants. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, Maringá. Anais... Maringá: SBZ, p. 120-128. Sá, L.; Nogueira, E. T. Atualização das relações valina e isoleucina com a lisina na proteína ideal para frangos de corte e suínos. 2010. Disponível em: <http://www.lisina.com.br/publicacoes>. Acesso em: 14 nov. 2017.

PEÑALVER, A., POCURULL, E., BORRULL, F., MARCÉ, R.M., Trends in solidphase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, Trends in analytical chemistry, 18, 8,557,(1999).

REZAEI, M. et al. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

ROCCA, P. et al. Bioquímica: técnicas y métodos. Editora Hélice, p. 134-147, 2003.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 252p. 2011.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal: Funep, 2007. 283p.

SIGMA-ALDRICH. **Bioanalysis with SPME**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>>. Acesso em: 28 jan 2018.

SILVA, C. A. Aditivos Promotores de Crescimento e Repartidores de Nutrientes na Nutrição de Suínos. Produção de Suínos: Teoria e Prática. ABCS, Brasília 2014.

SIRRI, F.; MELUZZI, A. Effect of sequential feeding on nitrogen excretion, productivity, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v, 91, n, 1 p. 316-321, 2012.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos da Química Analítica. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

SOUZA, V. F. Fitase: aspectos gerais e suas principais aplicações. Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica - ISSN 1982-422X, Vol. 6, número 2, jul-dez. 2011.

SUIDA, D. Formulação por proteína ideal e consequências técnicas, econômicas e ambientais. In: Simpósio Internacional de Nutrição Animal: Proteína Ideal, Energia Líquida e Modelagem, 2001, Santa Maria. Anais... Santa Maria: Embrapa, 2001. p.27-43.

TAVERNARI, F. C. Digestibilidade dos aminoácidos e valores energéticos do farelo de girassol e sua inclusão na ração de frangos de corte. Recife, PE: UFRPE, 2008.

TORRINHAS, R. Avaliação da quantidade e qualidade de nutrientes em estudos experimentais de nutrição. São Paulo: Apostila Universidade Paulista; 2004

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. Química Nova, v.23, n. 4, p.523-530, 2000.