



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Roberta de Oliveira Ramos

**Desenvolvimento de método para determinação de aminoácidos em amostras de  
formulações farmacêuticas e alimentos por eletroforese capilar de zona**

FLORIANÓPOLIS

2019

Roberta de Oliveira Ramos

**Desenvolvimento de método para determinação de aminoácidos em amostras de formulações farmacêuticas e alimentos por eletroforese capilar de zona**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Florianópolis

2019

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

Ramos, Roberta de Oliveira  
Desenvolvimento de método para determinação de  
aminoácidos em amostras de formulações farmacêuticas e  
alimentos por eletroforese capilar de zona / Roberta de  
Oliveira Ramos ; orientador, Luciano Vitali, 2019.  
109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletroforese Capilar. 3. Aminoácidos. 4.  
Hidrólise de Proteínas. I. Vitali, Luciano. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Química. III. Título.

Roberta de Oliveira Ramos

**Desenvolvimento de método para determinação de aminoácidos em amostras de formulações farmacêuticas e alimentos por eletroforese capilar de zona**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Josias Merib

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves

Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-DQ-UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química.

---

Prof. Dr.(a) Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Luciano Vitali  
Orientador

Florianópolis, 28 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PPGQMC e UFSC pela oportunidade e estrutura para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vitali pela orientação, ensinamentos, atenção, paciência, participação e suporte durante o trabalho.

Aos professores Dr. Josias Merib, Dr. Eduardo Sidinei Chaves e Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira que aceitaram compor a banca examinadora, dedicando parte do seu tempo para avaliar e contribuir com a melhoria dessa dissertação.

Ao CIF- UFSC, em especial aos professores Flávio, Simone, Marcos, Hellen, Diva e Thiago por disponibilizar o espaço, laboratórios e equipamentos para executar parte desse projeto.

À minha família que apesar da distância nunca deixou faltar amor e dedicação. Agradeço em especial aos meus pais Nilton e Claudete que sempre me incentivaram a estudar, aprender, evoluir e que é parte dessa conquista.

Ao meu amor Mauro, companheiro de vida, colega de profissão, amigo, parceiro de Grêmio, de viagens, muito obrigada pelo suporte, ajuda, compreensão nos momentos de ausência e principalmente pelo incessante carinho dedicado a mim ao longo do desenvolvimento do mestrado e de tantos anos juntos.

Aos Dartora e aos Dutra pelo incentivo e por compreenderem minha ausência em algumas ocasiões.

A toda a família LabCQ pela grande amizade, conversas, cafés, por dividir tantos momentos, por cada um me inspirar com o seu sucesso, por me estimular a ingressar no mestrado, por acolher uma química entre tantos farmacêuticos.

A todos os meus amigos que mesmo com a distância mantemos contato diário, sou muito grata pelo carinho, pelos momentos de descontração.

Aos colegas do LabEC pelo auxílio muitas vezes preciso, e por sempre me chamar para um bolinho, em especial ao Prof. Dr. Gustavo Micke pelos ensinamentos e à Giuliana por dividir disciplinas e pela companhia em alguns finais de semana de trabalho no laboratório.

Aos professores, servidores e colegas de outros laboratórios que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada Deus por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida, por me abençoar durante esse percurso. Gratidão a todos que de alguma forma participaram dessa conquista.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

(Marie Curie)

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo propor um método rápido e simples para a determinação dos aminoácidos triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina em amostras de diferentes matrizes utilizando a técnica de eletroforese capilar de zona. As amostras selecionadas foram de soluções parenterais injetáveis, medicamento composto por mistura de aminoácidos (indicado no tratamento dos distúrbios metabólicos hepáticos) e banana, sendo proposta nessa última, uma abordagem diferenciada das geralmente empregadas. O preparo de amostra para as soluções parenterais e medicamentos do estudo consistiu em diluição e homogeneização prévia à análise em equipamento de eletroforese capilar (CE - “*Capillary Electrophoresis*”) acoplado a detector UV com arranjo de diodos. Já para amostras de banana o preparo de amostra iniciou com o processamento em *mixer* e hidrólises ácida (com ácido clorídrico) e básica (com hidróxido de lítio) durante 22h em estufa a 110°C, seguido de neutralização/precipitação com carbonato de prata e ácido fosfórico para as hidrólises ácida e básica, respectivamente, a fim de reduzir a força iônica antes da injeção no equipamento de CE. A seleção das condições experimentais de separação por CE foi realizada empregando o *software Peakmaster*<sup>®</sup>. O eletrólito aquoso selecionado foi composto por 70 mmol L<sup>-1</sup> de butilamina e 20mmol L<sup>-1</sup> de ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico, com pH final de aproximadamente 11, utilizando ácido p-tolueno sulfônico como padrão interno em todas as análises. O capilar empregado de sílica fundida, com revestimento externo de poliacrilato tem 50 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. A injeção foi realizada por pressão hidrodinâmica durante 7s e a tensão de separação +30 kV. O tempo total para a determinação dos cinco aminoácidos de interesse foi de aproximadamente 5,5 min. O método foi validado seguindo as recomendações do ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). O método se mostrou linear na faixa estudada, de 5 mg L<sup>-1</sup> a 100 mg L<sup>-1</sup>, com  $r^2 > 0,99$  para todos analitos. A aplicação do método nas amostras de solução parenteral foi satisfatória para triptofano, fenilalanina e metionina. Para análise de medicamentos, foi possível quantificar uma das três amostras investigadas. O método proposto mostrou que a

análise de cinco aminoácidos por eletroforese capilar pode se tornar uma alternativa a ser implementada em controle de qualidade desses produtos. O preparo de amostras a ser utilizado em banana se mostrou inovador se comparado a outras formas frequentemente utilizadas no preparo dessas matrizes, porém ainda necessita de maiores estudos e aprimoramento, pois não foi conclusivo. Ao comparar o método proposto a outros trabalhos relatados na literatura que envolvem determinação de aminoácidos, nota-se considerável a redução de tempo e simplicidade dos procedimentos propostos.

**Palavras-chave:** Eletroforese capilar. Aminoácidos. Hidrólise de proteínas.

## ABSTRACT

The aim of this study was to propose a fast and simple method for the determination of the amino acids tryptophan, phenylalanine, histidine, methionine and tyrosine in samples of different matrices using a capillary zone electrophoresis technique. The selected samples were injectable parenteral solutions, a drug composed of a mixture of amino acids (indicated in the treatment of hepatic metabolic disorders) and banana, being proposed in this last approach differentiated from those generally employed. The sample preparation for parenteral solutions and drugs consisted of dilution and homogenization prior to analysis in capillary electrophoresis (CE) coupled to UV with diode-array detector. The sample preparation for banana begins with the processing in mixer and acid hydrolysis (with hydrochloric acid) and basic hydrolysis (with lithium hydroxide) for 22 h in an oven at 110 ° C, followed by neutralization/precipitation with silver carbonate and phosphoric acid for acid and basic hydrolysis, respectively, in order to reduce the ionic strength before injection into CE equipment. The selection of experimental conditions for CE separation was performed using *Peakmaster*<sup>®</sup> software. The selected aqueous electrolyte was composed of butylamine 70 mmol L<sup>-1</sup> and 3-N-morpholinopropanesulfonic acid 20 mmol L<sup>-1</sup>, with final pH of approximately 11 using p-toluene sulfonic acid as internal standard in all analyzes. The fused silica capillary with external polyacrylate coating is 50 µm in internal diameter, 48.5 cm in total length and 40 cm in effective length. The injection was performed by hydrodynamic pressure for 7s and the separation voltage +30 kV. The total time for the determination of these five amino acids was about 5,5 min. The method was validated following the recommendations of ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) and AOAC (Association of Official Analytical Chemists). The method was linear in the studied range, from 5 mg L<sup>-1</sup> to 100 mg L<sup>-1</sup>, with  $r^2 > 0.99$  for all analytes. The application in the parenteral solution was satisfactory for tryptophan, phenylalanine and methionine. Analysis of drugs, it was possible to quantify one of the three samples investigated. The method showed that the analysis of five amino acids by capillary electrophoresis can become an alternative to be implemented in quality control of these products. The sample preparation to be used in food has shown to be innovative compared to other forms frequently used in the preparation of these matrices, but still needs further studies

and improvement, since it was not conclusive. When comparing the proposed method to other studies reported in the literature involving amino acid determination, it was noticed the reduction of time and simplicity of the proposed procedures.

**Keywords:** Capillary Electrophoresis. Amino Acids. Protein Hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos aminoácidos triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina, com identificação de seus grupos R. ....	31
Figura 2 - Esquema abordando as considerações gerais da eletroforese capilar. ....	39
Figura 3 - Esquema de instrumentação básica da Eletroforese Capilar ....	41
Figura 4 - Esquema representando o sistema utilizado para realizar o condicionamento de capilares fora do equipamento de eletroforese capilar. ....	51
Figura 5 - Fluxograma dos experimentos para verificar o perfil do eletroferograma em diferentes condições de pH. (A) Hidrólise básica; (B) Hidrólise ácida.....	54
Figura 6 - Curvas de mobilidade efetiva dos analitos: triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina em função do pH. Os dados foram obtidos do <i>software PeakMaster</i> <sup>®</sup> e compilados no <i>software Excel</i> <sup>®</sup> a partir da Equação 7 e Equação 8.....	62
Figura 7 - Avaliação dos parâmetros da simulação das condições de separação dos AA usando o <i>software PeakMaster</i> <sup>®</sup> mantendo concentração fixa de 70 mmol L <sup>-1</sup> de butilamina e variando a concentração de MOPS de 10 mmol L <sup>-1</sup> a 35 mmol L <sup>-1</sup> . (A) Parâmetros do BGE <i>versus</i> a concentração de MOPS (pH, força iônica, capacidade tamponante e condutividade). (B) Mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) e dispersão por eletromigração (EMD) <i>versus</i> a concentração de MOPS. ....	64
Figura 8 - Eletroferogramas empregando as condições de separação selecionadas: (A) simulação com o <i>software PeakMaster</i> <sup>®</sup> e (B) injeção de mistura de padrões dos analitos e padrão interno todos a 30 mg L <sup>-1</sup> . Condições experimentais: BGE: butilamina 70 mmol L <sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 11, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3- His, 4- Met, 5- PI, 6- Tyr. ....	65
Figura 9 - Eletroferogramas da separação dos analitos utilizando mistura de padrões de analitos e PI todos com concentração de 30 mg L <sup>-1</sup> . BGE em vial de vidro (1500 $\mu\text{L}$ ): (A) Primeira injeção, (B) Após 40 injeções consecutivas e (C) Após 50 injeções consecutivas. BGE em vial de plástico (750 $\mu\text{L}$ ): (D) Primeira injeção, (E) Após 15 injeções consecutivas e (F) Após 50 injeções consecutivas. Condições da separação: butilamina 70 mmol L <sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 11, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com	

48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr. .... 67

Figura 10 - Gráfico relacionando altura e resolução entre os picos em função do tempo de injeção utilizando mistura de padrões de analitos e PI todos com concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>. Condições da separação: Variação dos tempos de injeção: de 3s a 30s, butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11, injeção +30 kV, 50 mbar, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210nm. .... 69

Figura 11 - Eletroferogramas experimentais da separação utilizando a ferramenta do *software HP ChemStation*<sup>®</sup> para investigar a seletividade através da pureza de pico: (a) padrão dos cinco aminoácidos e padrão interno, todos na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>. Condições de separação: BGE 70 mmol L<sup>-1</sup> de butilamina e 20 mmol L<sup>-1</sup> de MOPS, pH 11, injeção 50 mbar, 7 s, 30 kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm efetivo, 75 µm de diâmetro interno, detecção direta em 210 nm. .... 72

Figura 12 - Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*<sup>®</sup> com concentração fixa de butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup>, variando a concentração MOPS entre 9 a 33 mmol L<sup>-1</sup>. Condições da simulação para separação: injeção +30 kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo, detecção direta com correção da força iônica. .... 74

Figura 13. Gráficos de resíduos da regressão linear das curvas externas dos analitos: Trp, Phe, His, Met e Tyr. .... 76

Figura 14. Eletroferogramas comparativos de: (A) mistura de padrões de AA e PI todos na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>, (B) amostra de solução parenteral diluída 100 vezes em água adicionada de padrão interno na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>. Condições experimentais: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,01, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr. .... 85

Figura 15. Eletroferogramas comparando o perfil de separação utilizando diferentes diluições nas 3 amostras de medicamento de diferentes marcas. (A1) amostra A diluída 200 vezes, (A2) amostra A diluída 100 vezes, (B1) amostra B diluída 200 vezes, (B2) amostra B diluída 100 vezes, (C1) amostra C diluída 200 vezes, (C2) amostra C diluída 100 vezes. Condições experimentais: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,01, injeção +30kV,

50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1-sinal desconhecido, 2- Metionina, PI – Padrão Interno. ....	86
Figura 16. Seletividade avaliada através da ferramenta do <i>software PeakMaster</i> <sup>®</sup> para verificar a pureza de pico referente à metionina da amostra A diluída 100 vezes. Condições experimentais: BGE: butilamina 70 $\text{mmol L}^{-1}$ e MOPS 20 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 11,01, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: Met- Metionina, PI – Padrão Interno. ....	87
Figura 17. Eletroferograma simulado no <i>software PeakMaster</i> <sup>®</sup> para visualizar sacarina e metionina. Condições da simulação para separação: BGE butilamina 70 $\text{mmol L}^{-1}$ e MOPS 20 $\text{mmol L}^{-1}$ . Injeção +30kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção direta com correção da força iônica. Legenda: Met- Metionina, Sac- Sacarina. ....	88
Figura 18. Variação de pH e corrente observadas para cada volume de $\text{H}_3\text{PO}_4$ adicionado a 5,0 mL de solução de LiOH 4,0 $\text{mol L}^{-1}$ .....	90
Figura 19. Comparação do perfil de separação para cada uma das condições avaliadas na solução utilizada em hidrólise básica e padrão: (A) solução padrão 30 $\text{mg L}^{-1}$ , (B) ponto B, (C) ponto C, (D) ponto D, (E) ponto E, (F) ponto F, (G) ponto G, (H) ponto H, (I) ponto I e (J) ponto J. Condições de separação: BGE:butilamina 70 $\text{mmol L}^{-1}$ e MOPS 20 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 10,98, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr. ....	92
Figura 20. Eletroferogramas comparando (A) padrão 50 $\text{mg L}^{-1}$ com os extratos pós hidrólise de banana: (B) pH 12,86, (C) pH 12,4, (D) pH 6,37; (E) ponto B diluído com padrões, (F) ponto C diluído com padrões e (G) ponto D diluído com padrões. Condições de separação: BGE: butilamina 70 $\text{mmol L}^{-1}$ e MOPS 20 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 11,0, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 $\mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. ....	94
Figura 21. Variação de pH e corrente observadas para cada massa de $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ adicionada à solução de HCl 6,0 $\text{mol L}^{-1}$ .....	95

Figura 22. Comparação do perfil de separação para cada uma das condições avaliadas na solução utilizada em hidrólise ácida e padrão: (A) solução padrão 50 mg L<sup>-1</sup>, (E) ponto E, (F) ponto F, (G) ponto G, (H) ponto H e (I) ponto I. Condições de separação: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,0, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr. ....97

Figura 23. Comparação do perfil de separação: (A) solução padrão 50 mg L<sup>-1</sup>, (H) ponto H diluído 20 vezes em BGE, em água e em solução de padrões (concentração final 50mg L<sup>-1</sup>), (I) ponto I diluído 20 vezes em BGE, em água e em solução de padrões (concentração final 50mg L<sup>-1</sup>). Condições de separação: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,00, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr. ....98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações de nomenclatura e dados de pKados AA utilizados neste estudo. ....	30
Tabela 2 - Diferentes condições de pH do BGE para avaliação de robustez. *A e B são capilares de diferentes marcas .....	60
Tabela 3 - Dados de pKa e mobilidade eletroforéticas dos aminoácidos do estudo, padrão interno e BGE. Todos os dados foram obtidos do software Peakmaster®.....	61
Tabela 4- Coeficiente de variação da razão das áreas e dos tempos de migração dos analitos, para vial com 750 µL de capacidade entre injeção 1 e 15, e para vial com 1500 µL de capacidade entre as injeções 1 e 40, e 1 e 50.....	68
Tabela 5 - Resultados de CV para os parâmetros de área corrigida e tempo de migração, e de média para os parâmetros de número de pratos e resolução, todos obtidos com triplicata de preparo e injeção de soluções padrões em cinco níveis de concentração.....	71
Tabela 6. Resultados de linearidade, desvio padrão inclinação e intercepto da curva de calibração com nove níveis de concentração preparados e injetados em triplicata, com correção de área de todos os analitos com padrão interno. ....	75
Tabela 7. Resultados de recuperação para os analitos Trp, Phe, His, Met, e Tyr em amostras de solução parenteral. ....	77
Tabela 8. Resultados de recuperação para Metem amostra de Hepatoprotetor.....	77
Tabela 9. Valores de repetibilidade, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata. ....	78
Tabela 10. Valores de precisão intermediária, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata. ....	79
Tabela 11. Valores de reprodutibilidade, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata. ....	80
Tabela 12. Valores de CV (%) para tempo de migração e área do pico corrigida, para avaliação da robustez, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata, em diferentes condições de pH: 11,00 e 11,25 com diferentes colunas capilares do mesmo fabricante.....	82
Tabela 13. Comparação entre os dados de concentração presentes no rótulo do produto e o resultado encontrado ao realizar a análise para as amostras A e B. ....	83

Tabela 14. Resultados encontrados para metionina na amostra A de medicamento e teste <i>t-Student</i> . .....	88
Tabela 15. Valores da variação de pH e corrente observadas para cada volume de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> P.A. adicionado a 5 mL de uma solução de LiOH 4,0 mol L <sup>-1</sup> , para cada um dos pontos estudados. ....	90
Tabela 16. Valores da variação de pH observada para cada volume de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> adicionado a 5 mL do extrato obtido após a hidrólise básica. ....	93
Tabela 17. Valores da variação de pH e corrente observadas para cada massa de Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> adicionada a 5 mL solução de HCl 6,0 mol L <sup>-1</sup> , para cada um dos pontos estudados.....	95
Tabela 18. Alguns métodos utilizados na determinação de aminoácidos, com suas principais características.....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AA – Aminoácido

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ala – Alanina (do inglês, “*Alanine*”)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês, “*Association of Official Analytical Chemists*”)

Arg – Arginina (do inglês, “*Arginine*”)

Asn – Asparagina (do inglês, “*Asparagine*”)

Asp – Ácido Aspártico (do inglês, “*Aspartic Acid*”)

BGE – Eletrólito de fundo ou eletrólito de corrida (do inglês, “*Background Electrolyte*”)

CE – Eletroforese Capilar (do inglês, “*Capillary Electrophoresis*”)

CE-UV – Eletroforese Capilar com Detecção Espectrofotométrica na Região do Ultravioleta-Visível (do inglês, “*Capillary Electrophoresis with Ultraviolet-Visible Absorbance Detection*”)

CGE – Eletroforese Capilar em Gel (do inglês, “*Capillary Gel Electrophoresis*”)

CITP – Isotacoforese Capilar (do inglês, “*Capillary Isotachophoresis*”)

Cys – Cisteína (do inglês, “*Cysteine*”)

CZE – Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, “*Capillary Zone Electrophoresis*”)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês, “*Deoxyribonucleic Acid*”)

EKC – Cromatografia Eletrocínética (do inglês, “*Electrokinetic Chromatography*”)

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EOF – Fluxo Eletrosmótico (do inglês “*Electroosmotic Flow*”)

FSCE – Eletroforese Capilar em Solução Livre (do inglês, “*Free Solution Capillary Electrophoresis*”)

GC-MS – Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês “*Gas Chromatography–Mass Spectrometry*”)

Gln – Glutamina (do inglês, “*Glutamine*”)

Glu – Ácido Glutâmico (do inglês, “*Glutamic Acid*”)

Gly – Glicina (do inglês, “*Glycine*”)

His – Histidina (do inglês, “*Histidine*”)

HPLC-ESI-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de massas com Ionização por Eletrospray (do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*”)

ICH – *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

Ile – Isoleucina (do inglês, “*Isoleucine*”)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO/IEC 9000 – Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, “*International Electrotechnical Commission*”)

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas em “*Tandem*” (do inglês, “*Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*”)

LD – Limite de Detecção

Leu – Leucina (do inglês, “*Leucine*”)

LQ – Limite de Quantificação

Lys – Lisina (do inglês, “*Lysine*”)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEKC – Cromatografia Eletrocínética Micelar (do inglês, “*Micellar Electrokinetic Chromatography*”)

Met – Metionina (do inglês, “*Methionine*”)

MOPS – Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico (do inglês, “*3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid*”)

MS – Espectrômetro de Massas (do inglês, “*Mass Spectrometer*”)

NBR – Norma Brasileira

Phe – Fenilalanina (do inglês, “*Phenylalanine*”)

PKU – Fenilcetonúria (do inglês, “*Phenylketonuria*”)

Pro – Prolina (do inglês, “*Proline*”)

RNA – Ácido Ribonucléico (do inglês, “*Ribonucleic Acid*”)

Ser – Serina (do inglês, “*Serine*”)

Thr – Treonina (do inglês, “*Threonine*”)

Trp – Triptofano (do inglês, “*Tryptophan*”)

Tyr – Tirosina (do inglês, “*Tyrosine*”)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM – Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (do inglês, “*International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology*”)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1	OBJETIVOS.....	27
1.1.1	<b>Objetivos Gerais</b> .....	<b>27</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>revisão da literatura</b> .....	<b>28</b>
2.1	AMINOÁCIDOS.....	28
2.1.1	<b>Triptofano (Trp)</b> .....	<b>31</b>
2.1.2	<b>Fenilalanina (Phe)</b> .....	<b>32</b>
2.1.3	<b>Histidina (His)</b> .....	<b>33</b>
2.1.4	<b>Metionina (Met)</b> .....	<b>33</b>
2.1.5	<b>Tirosina (Tyr)</b> .....	<b>33</b>
2.1.6	<b>Aminoácidos em soluções parenterais, medicamentos e alimentos</b> .....	<b>34</b>
2.2	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS .....	36
2.3	PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS .....	37
2.4	ELETROFORESE CAPILAR (CE).....	37
2.4.1	<b>Técnica de Eletroforese Capilar de Zona</b> .....	<b>40</b>
2.4.2	<b>Software Peakmaster<sup>®</sup></b> .....	<b>40</b>
2.4.3	<b>Instrumentação básica da eletroforese capilar</b> .....	<b>41</b>
2.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	42
2.5.1	<b>Conformidade do sistema</b> .....	<b>43</b>
2.5.2	<b>Seletividade – Especificidade</b> .....	<b>44</b>
2.5.3	<b>Linearidade – Faixa de trabalho</b> .....	<b>44</b>
2.5.4	<b>Exatidão</b> .....	<b>45</b>

<b>2.5.5</b>	<b>Precisão.....</b>	<b>45</b>
2.5.5.1	Repetibilidade.....	46
2.5.5.2	Precisão Intermediária.....	46
2.5.5.3	Reprodutibilidade.....	46
<b>2.5.6</b>	<b>Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....</b>	<b>47</b>
<b>2.5.7</b>	<b>Robustez.....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	SOFTWARES.....	49
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	49
3.3	CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO.....	50
<b>3.3.1</b>	<b>Coluna capilar.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Composição do eletrólito de corrida e parâmetros instrumentais selecionados.</b>	<b>51</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Estabilidade do eletrólito de corrida.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Seleção do tempo de injeção.....</b>	<b>52</b>
3.4	INSTRUMENTAÇÃO.....	52
3.5	AMOSTRAS.....	53
<b>3.5.1</b>	<b>Solução parenteral.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Medicamento contendo metionina.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Preparo de amostra de banana.....</b>	<b>54</b>
3.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	56
<b>3.6.1</b>	<b>Conformidade do sistema.....</b>	<b>56</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Seletividade – Especificidade.....</b>	<b>57</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Linearidade – Faixa de trabalho.....</b>	<b>57</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Exatidão.....</b>	<b>58</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Precisão.....</b>	<b>58</b>
3.6.5.1	Repetibilidade.....	58

3.6.5.2	Precisão Intermediária .....	58
3.6.5.3	Reprodutibilidade .....	59
<b>3.6.6</b>	<b>Limites de detecção (LD) .....</b>	<b>59</b>
<b>3.6.7</b>	<b>Limite de quantificação (LQ) .....</b>	<b>59</b>
<b>3.6.8</b>	<b>Robustez .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	61
4.1.1	Composição do eletrólito de corrida e escolha de pH .....	61
4.1.2	Estabilidade do eletrólito .....	66
4.1.3	Seleção do tempo de injeção .....	69
4.2	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO .	70
4.2.1	Conformidade do sistema .....	70
4.2.2	Seletividade .....	72
4.2.3	Linearidade – Faixa de trabalho.....	75
4.2.4	Exatidão.....	76
4.2.5	Precisão.....	77
4.2.6	Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) .....	81
4.2.7	Robustez .....	81
4.3	DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NAS AMOSTRAS.....	83
4.3.1	Soluções Parenterais.....	83
4.3.2	Medicamentos .....	86
4.3.3	Banana.....	89
4.3.3.1	Hidrólise básica .....	89
4.3.3.2	Hidrólise ácida – neutralização/precipitação com Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	94
4.4	COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS .....	99
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são ácidos carboxílicos que contém o grupo amino, são pequenas moléculas que se agrupam para formação das proteínas, ou seja, são as unidades básicas da composição de uma proteína.(MANIG et al., 2017; ROGERO; TIRAPGUI, 2008) Também são os precursores de diferentes substâncias biológicas, como de hormônios ou neurotransmissores desempenhando um papel biologicamente importante nos organismos vivos, sendo vitais no metabolismo humano.(CUI et al., 2014)

Os aminoácidos são classificados em dois grupos: essenciais e não essenciais. Os do primeiro grupo, chamados essenciais, ou indispensáveis, são os que o organismo humano não tem capacidade de sintetizar, devendo ser incluídos na dieta alimentar, obtidos através da ingestão de determinados alimentos protéicos. Os considerados não essenciais são aqueles que o organismo consegue sintetizar (NELSON; COX, 2002).

Existem mais de 300 aminoácidos naturais, mas somente vinte compõem as proteínas. Desses, no entanto, os humanos adultos não sintetizam nove, os quais fazem parte da categoria de aminoácidos essenciais (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, lisina, triptofano, histidina e metionina), devendo ser obtidos a partir da alimentação (VOLLHARDT; SCHORE, 2004). Algumas das funções desses vinte aminoácidos no organismo como precursores de outras biomoléculas estão atribuídas à melhora do humor, concentração, memória, força e resistência muscular, atuação como antidepressivo, participação na biossíntese de DNA e RNA, manutenção do funcionamento normal e desintoxicação do fígado, auxílio na redução dos níveis de colesterol no sangue, estimulação do hormônio do crescimento, ajuda na proteção do sistema nervoso central, entre outras características associadas à saúde e qualidade de vida (OTASEVIC; KORAC, 2016).

A fenilalanina e a tirosina são aminoácidos que exigem maior atenção por estar relacionados à fenilcetonúria e a tirosinemia, respectivamente. Essas são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas por níveis elevados de fenilalanina ou tirosina, devido a mutações nos genes que afetam o metabolismo desses aminoácidos. Os fenilcetonúricos apresentam um erro inato no metabolismo da fenilalanina que resulta em um aumento na concentração plasmática desse aminoácido, podendo ocasionar entre outros danos, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hiperatividade, convulsões, eczemas hipopigmentação,

sendo a sequela considerada mais importante o retardo mental progressivo e irreversível (ANVISA, 2012). Já a tirosinemia é uma doença mais rara causada pela mutação dos genes que codificam as enzimas que atuam na metabolização da tirosina, prejudicando a função das enzimas e ocasionando acúmulo desse aminoácido e seus metabólitos nos rins, fígado, se tornando tóxico e afetando esses órgãos (EL-HATTAB, 2015).

O tratamento dessas doenças é feito por acompanhamento nutricional, através de dieta rigorosa com restrição de consumo dos alimentos que sejam fontes desses aminoácidos. O tratamento da tirosinemia ocorre, além da dieta, com complementação de medicamentos específicos (DEMIRBAS; BRUCKER; BERRY, 2015), uma vez que a tirosina tratando-se de um aminoácido não essencial, não é somente obtida através dos alimentos, mas também produzida pelo organismo. Porém, para o tratamento da fenilcetonúria não há medicamentos. Os profissionais que acompanham os fenilcetonúricos, em geral, buscam informações sobre os teores de fenilalanina nos alimentos em diversas tabelas de composição, mas as informações disponíveis muitas vezes não atendem aos critérios de qualidade necessários, seja por ser de fonte estrangeira, dados antigos ou ainda por se tratar de alimentos industrializados, em que pode haver variação no teor, tornando ainda mais difícil o conhecimento sobre as concentrações de fenilalanina (ANVISA, 2017).

Considerando os alimentos e suplementos alimentares como fonte de aminoácidos para os humanos, e ainda as doenças descritas anteriormente, é de grande importância o monitoramento desses compostos nas amostras citadas (ARISTOY; TOLDRÁ, 2015). Para isso, existem muitas técnicas analíticas descritas na literatura entre as quais se destacam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização Eletrospray (HPLC-ESI-MS)(ZHENG et al., 2015), ou com detecção Ultravioleta (HPLC-UV)(CHECA-MORENO et al., 2008), a Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)(DAUNER; SAUER, 2000; PERSSON; NÄSHOLM, 2001), e a Eletroforese Capilar com detecção por Ultravioleta (CE-UV) (HAN; CHEN, 2007; XU et al., 2015).

Entretanto, os métodos empregando tais técnicas apresentam tempos longos de separação, pois envolvem a análise de vários aminoácidos. Além disso, devem ser consideradas questões como o custo das análises, a eficiência das separações entre outras características que possam tornar o método vantajoso.

A técnica de Eletroforese Capilar (CE, do inglês, “*Capillary Electrophoresis*”) vem ganhando destaque por suas inúmeras vantagens, tratando-se também de uma alternativa para a análise de aminoácidos, uma vez que envolve baixo consumo de amostra e solventes, possui alta velocidade de análise, realiza separações de alta eficiência, possui uma simples instrumentação e baixo custo, além de não fazer o uso de bombas de alta pressão, como no método utilizando Cromatografia Líquida. Além disso, a análise por CE gera pouco volume de resíduo e de baixa toxicidade, se comparada a outras técnicas (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A análise de aminoácidos ainda envolve uma etapa muito importante que é o preparo das amostras, pois esses compostos geralmente encontram-se na forma polipeptídica, havendo necessidade de realizar procedimentos para que seja possível sua análise. A hidrólise ácida é recomendada para a determinação de grande parte dos aminoácidos, com exceção do triptofano, que é degradado nesse tipo de hidrólise, sendo, para este analito, recomendada a hidrólise básica (DE ARAÚJO; DE ASSIS JR; SOBREIRA, 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho descreve um método para a análise de cinco aminoácidos (fenilalanina, triptofano, metionina, histidina e tirosina) em formulações farmacêuticas e banana, fazendo o uso da técnica de eletroforese capilar em zona com detecção UV. O trabalho ainda reúne uma breve investigação sobre a aplicação do método para amostras de alimentos após passar por procedimento de hidrólise, utilizando os princípios de neutralização e precipitação. A escolha desses cinco aminoácidos para o estudo se justifica pela importância que esses compostos possuem como síntese de proteínas, precursores de outras biomoléculas, especialmente neurotransmissores, interferindo diretamente na saúde. Além disso, apresentam grupos cromóforos em sua estrutura, o que corrobora para realizar a detecção direta por Espectrometria na Região do Ultravioleta, visto que essas moléculas absorvem radiação nessa região do espectro.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver um método por CZE para separação e quantificação dos aminoácidos fenilalanina, histidina, metionina, tirosina e triptofano com o auxílio de simulação com o *software Peakmaster*<sup>®</sup>, validar o método proposto e aplicá-lo em análises dos aminoácidos selecionados em amostras de soluções parenterais, medicamentos e banana.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Desenvolver um método por CZE para separação dos aminoácidos Phe, His, Met, Tyr, e Trp utilizando inicialmente o *software Peakmaster*<sup>®</sup> para escolha adequada das condições de separação.

Aplicar as condições de separação selecionadas no *software Peakmaster*<sup>®</sup>, em soluções padrão dos aminoácidos estudados para promover separações experimentais.

Avaliar e otimizar outros parâmetros experimentais, tais como tempo de injeção e comprimento de onda ideal para análise simultânea dos cinco aminoácidos.

Avaliar a capacidade tamponante e a durabilidade do eletrólito ao longo de injeções consecutivas.

Validar o método proposto verificando os parâmetros analíticos seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites detecção e quantificação e robustez.

Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de soluções parenterais.

Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de medicamentos que contenham metionina.

Avaliar o uso de hidrólises ácidas e básicas seguidas de neutralização/precipitação, como alternativa no preparo de amostra de alimentos para análise de aminoácidos em banana.

Aplicar o método desenvolvido em amostra de banana.

Comparar o método proposto com outros já descritos na literatura.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos (AA) são compostos que contêm em sua estrutura os grupos funcionais amina ( $-\text{NH}_2$ ) e ácido carboxílico ( $-\text{COOH}$ ), foram descritos no início do século XIX (MANIG et al., 2017). Devido à presença desses grupos (carbóxi e amino) são anfóteros, ou seja, apresentam caráter ácido e básico (VOLLHARDT; SCHORE, 2004). Esses compostos são essenciais para a vida (CUI et al., 2014), pois são as unidades básicas da composição de uma proteína (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). A ligação de dois ou mais AA forma moléculas chamadas peptídeos, sendo cada AA em um peptídeo denominado resíduo. As moléculas com muitas ligações de AA são polipeptídeos e as com cadeias longas de polipeptídeos são as proteínas (SKOOG et al., 2005). Os aminoácidos desempenham um papel biologicamente importante nos organismos vivos (ALI; AKHTAR; GOHAIN, 2016), pois atuam na composição das proteínas e possuem muitas funções indispensáveis no metabolismo (CUI et al., 2014).

Embora a presença e a estrutura de mais de 300 aminoácidos diferentes tenham sido descritas, na natureza, apenas vinte desses são comumente encontrados como constituintes de proteínas (MANIG et al., 2017; OVERVIEW, 2003). Esses vinte são definidos como AA primários, os quais são atribuídos dois tipos de abreviaturas (de três letras e de uma letra) utilizadas para indicar sua composição e sequência nas proteínas (NELSON; COX, 2002). São esses: Glicina (Gly), Alanina (Ala), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Fenilalanina (Phe), Prolina (Pro), Serina (Ser), Treonina (Thr), Tirosina (Tyr), Asparagina (Asn), Glutamina (Gln), Lisina (Lys), Arginina (Arg), Triptofano (Trp), Histidina (His), Cisteína (Cys), Metionina (Met), Ácido Aspártico (Asp) e Ácido Glutâmico (Glu) (FUKUMOTO; YOSHIZAWA; OHNO, 2005; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

Todos os vinte AA primários são  $\alpha$ -aminoácidos, ou 2-aminoácidos, cuja fórmula geral é representada por  $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , que possuem uma carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono  $\alpha$  ou C2), diferem entre si por seus grupos R, que apresentam distinta estrutura, tamanho e carga elétrica, fatores que influenciam na solubilidade dos AA em meio aquoso. O grupo R pode ser alquila ou arila e conter outros

grupos como hidróxi, amino, mercapto, sulfeto, carbóxi, guanidino e imidazol(NELSON; COX, 2002; VOLLHARDT; SCHORE, 2004). Com exceção da glicina, os outros 19 aminoácidos têm centros quirais e enantiômeros (L) e (D) (CUI et al., 2014). O carbono  $\alpha$ , centro quiral, liga-se a quatro grupos substituintes diferentes (carboxila, amino, grupo R e um átomo de hidrogênio) que podem ocupar duas diferentes posições espaciais, imagens especulares não sobreponíveis, formas essas chamadas enantiômeros, uma classe de esteroisômeros(NELSON; COX, 2002).

Considerando as propriedades dos grupos R, em especial a polaridade ou tendência para interagir com a água em pH biológico (aproximadamente pH 7), pode-se agrupar os AA em 5 classes principais: grupos R não polares e alifáticos, grupos R aromáticos, grupos R não carregados, mas polares, grupos R carregados positivamente (básicos) e grupos R carregados negativamente (ácidos) (NELSON; COX, 2002).

Os AA também podem ser especificados basicamente em duas categorias, os essenciais e os não-essenciais, dependendo da sua disponibilidade metabólica no corpo humano. Os AA essenciais são aqueles que precisam ser obtidos obrigatoriamente através da alimentação, pois não são sintetizados endogenamente pelo organismo humano, devendo estar presentes diariamente na dieta alimentar (NELSON; COX, 2002).Existem divergências quanto ao número de aminoácidos considerados de cada categoria, sendo que as referências encontradas sugerem de 8 a 10 como AA essenciais daqueles 20 citados anteriormente (BARRETT, 1985)(ROGERO; TIRAPEGUI, 2008), sendoestes: Arginina (essencial para indivíduosjovemsemcrescimento, não para adultos), Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Valina. O grupo dos aminoácidos não essenciais compreende os compostos que nosso organismo é capaz de sintetizar, representados por Alanina, Asparagina, Asparato, Cisteína, Glutamato, Glutamina, Glicina, Prolina, Serina e Tirosina (NELSON; COX, 2002; VOLLHARDT; SCHORE, 2004). A cisteína e a tirosina ocupam posição ambígua nessa classificação, uma vez que podem ser sintetizadas pelo corpo, mas a partir de precursores, os aminoácidos essenciais metionina e fenilalanina, respectivamente, ou seja, não são considerados essenciais, mas sua presença auxilia a economizar de seus precursores, metionina e fenilalanina (BARRETT, 1985).

Além de importantes na composição das proteínas, os aminoácidos atuam também como precursores de biomoléculas, tais como hormônios, coenzimas, nucleotídeos, alcalóides,

polímeros de paredes celulares, porfirinas, antibióticos, pigmentos e neurotransmissores (NELSON; COX, 2002). Os neurotransmissores são mensageiros químicos endógenos que transmitem, aumentam e convertem sinais específicos entre neurônios e outras células, incluem dopamina, acetilcolina, serotonina, epinefrina, norepinefrina, óxido nítrico, glutamato e triptamina. Sua importância está relacionada a várias funções cerebrais, como comportamento e cognição. São responsáveis por auxiliar no ajuste da frequência cardíaca, regular a aprendizagem, sono, memória, consciência, humor e apetite (HASANZADEH; SHADJOU; GUARDIA, 2017).

Devido à onipresença e à alta variabilidade de AA em diversas matrizes, a detecção de AA tornou-se parte integrante da ciência da vida (MANIG et al., 2017). A determinação de aminoácidos protéicos tem sido investigada em alimentos, pois esses compostos fornecem informações relevantes sobre a qualidade e segurança nesse tipo de amostra (PÉREZ-MÍGUEZ; MARINA; CASTRO-PUYANA, 2016). Considerando os alimentos e suplementos alimentares como fonte de aminoácidos para os humanos, é interessante o seu monitoramento nessas amostras comparando a contribuição efetiva de cada um para a dieta (ZHENG et al., 2015).

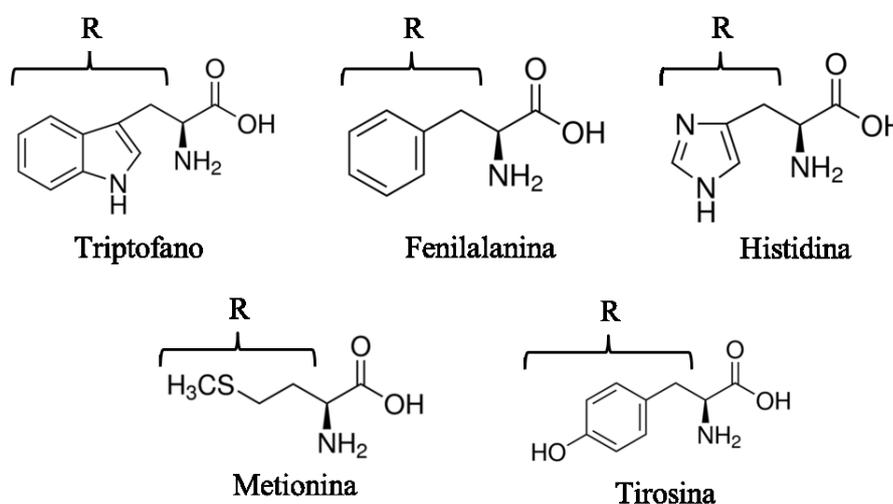
A Tabela 1 apresenta os principais dados, como pKa, classificações e abreviaturas e a Figura 1 mostra as estruturas dos cinco AA deste estudo: Phe, His, Met, Tyr e Trp.

Tabela 1 - Informações de nomenclatura e dados de pKados AA utilizados neste estudo.

AA	3 letras 1 letra	pK <sub>a</sub> (NH <sub>2</sub> )	pK <sub>a</sub> (COOH)	pK <sub>a</sub> (R)	Essencial ou não	Grupo R
Triptofano	Trp/W	9,594	2,310	-	Essencial	R aromático
Fenilalanina	Phe/F	9,292	2,130	-	Essencial	R aromático
Histidina	His/H	9,330	2,010	6,04	Essencial	R carregado positivamente
Metionina	Met/M	9,344	2,130	-	Essencial	R não polar e alifático
Tirosina	Tyr/Y	9,099	2,180	10,189	Não essencial	R aromático

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2002; “PeakMaster 5.3”, 2011; “Sigma Aldrich”, 2017; VOLLHARDT; SCHORE, 2004)

Figura 1 - Estruturas dos aminoácidos triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina, com identificação de seus grupos R.



Fonte: (“Sigma Aldrich”, 2017)

### 2.1.1 Triptofano (Trp)

O triptofano é um aminoácido necessário para a biossíntese de proteínas e, também, é o precursor de uma grande quantidade de metabólitos biologicamente ativos (DE JONG et al., 2009). Junto à biossíntese de proteínas, o Trp exerce a função de agir como um precursor bioquímico de substâncias de atividades tipicamente fisiológicas, incluindo a melatonina, a niacina, a serotonina e a triptamina (VAN DER GOOT; NOLLEN, 2013; YOUNG; LEYTON, 2002; ZHANG et al., 2009). A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor bastante conhecido por estar presente em mamíferos e em plantas (ISLAM et al., 2016). A atividade neurotransmissora de serotonina no sistema nervoso central afeta a ansiedade, a appetite, o comportamento sexual, o humor, as interações sociais e o sono (YOUNG; LEYTON, 2002).

Um desequilíbrio ou a perda de Trp em seus produtos metabólicos pode resultar em problemas fisiopatológicos (REILLY, MCTAVISH e YOUNG, 1997; BENJAMIN e Klein, 2010; KEGEL et al., 2014). Pesquisas realizadas mostraram que comportamentos sociais como, por exemplo, a irritabilidade e a agressão, bem como certas desordens, estão relacionadas com distúrbios no funcionamento do sistema serotoninérgico (LESCH et al., 2012; SELVARAJ et al., 2014; WILLIAMS; HAZELL, 2010). Estudos apresentados na literatura relatam que desordens neurológicas podem estar relacionadas com um determinado desequilíbrio metabólico de Trp e Tyr (MARCOS et al., 2016).

### 2.1.2 Fenilalanina (Phe)

A fenilalanina é considerada um aminoácido essencial, entretanto, a incapacidade de metabolizar a Phe no caso de pessoas afetadas pela doença metabólica chamada fenilcetonúria (PKU), o acúmulo desse aminoácido em fluídos corporais provoca danos ao sistema nervoso central e ao cérebro (HUTTENLOCHER, 2000; KIM; BOUTIN, 2014). A PKU é causada pela deficiência de atividade da fenilalanina hidroxilase (ARTURO et al., 2016). Sabendo que toda proteína natural possui fenilalanina, os fenilcetonúricos não consomem alimentos proteicos em sua dieta.

Os distúrbios dessa doença são um acúmulo de fenilalanina no soro e anormalidades associadas no metabolismo de aminoácidos aromáticos, podendo causar retardo mental irreversível, que pode ser reduzido ou evitado pela restrição da ingestão de fenilalanina. Verificando que quanto mais cedo essa restrição de ingestão de fenilalanina inicia, melhores são os resultados aos indivíduos portadores da doença, surgiu à necessidade da triagem neonatal abrangente para PKU com base na determinação dos níveis séricos de fenilalanina no período neonatal (EISENSMITH; WOO, 1992). No Brasil, essa triagem neonatal acontece desde 1992 através do teste do pezinho, quando a legislação federal definiu Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito como as patologias a serem triadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Devido à importância de conhecer a quantidade de Phe nos alimentos, para alimentos *in natura* a partir de seu conteúdo proteico, a ANVISA criou uma tabela com valores estimados desse aminoácido, compilando os dados de proteína, obtidos por análise química pelo método de Kjeldahl e conversão do nitrogênio total em proteína, constantes de três Tabelas Nacionais de Composição de Alimentos: Tabela de Composição de Alimentos para Fenilcetonúricos, Tabela Brasileira de Composição em Alimentos (TBCA), desenvolvidas pelo Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), desenvolvida pelo Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas. As análises foram realizadas em alimentos e bebidas com teores proteicos entre 0,10 e 5,00%. Para alimentos industrializados, as análises são de responsabilidade das empresas fabricantes (ANVISA, 2012).

### **2.1.3 Histidina (His)**

A histidina é o aminoácido precursor da histamina, um neurotransmissor que está ligado a diversas funções cerebrais (SASAHARA et al., 2015). A histamina neural funciona como neurotransmissor a partir de quatro tipos de receptores de histamina, H1, H2, H3 e H4. Estes receptores modulam atividades cerebrais como a aprendizagem, memória e estresse. Os receptores do tipo H1, por exemplo, moderam diversas funções fisiológicas, como a apetite e a emoção (YANAI; TASHIRO, 2007). Outra informação interessante é que pessoas com depressão possuem diminuição do receptor de ligação histamina H1 no cérebro, o que faz com que os sintomas da doença agravem-se (KANO et al., 2004). Além disso, um possível bloqueio no receptor da histamina H1, como os anti-histamínicos, causa sonolência e diminui o desempenho psicomotor (TASHIRO et al., 2002). A histidina, precursor da histamina, quando ingerida pode também contribuir para a redução da fadiga mental em seres humanos (SASAHARA et al., 2015).

### **2.1.4 Metionina (Met)**

A metionina é uma das principais fontes de enxofre no corpo e, dessa forma, desempenha uma função muito importante em reações de transulfuração, resultando, por exemplo, na síntese da cisteína, outro aminoácido que contribui para diversas funções no organismo (KHOSRAVI et al., 2016). Dentre essas, inclui-se: (i) os metabólitos da cisteína que possuem grande importância na defesa antioxidante, a qual ajuda a melhorar inflamações crônicas; (ii) a suplementação da cisteína diminui a capacidade de resposta da insulina em jejum; (iii) em diversos ensaios clínicos percebeu-se que a suplementação da cisteína melhorou as funções do músculo esquelético, melhorou funções imunitárias e aumentou os níveis de albumina plasmáticas (DRÖGE, 2005; MCPHERSON; HARDY, 2011).

### **2.1.5 Tirosina (Tyr)**

A tirosina é sintetizada a partir da Phe através da ação da enzima fenilalanina hidroxilase, sendo que a principal via metabólica para a Tyr envolve sua transformação no

neurotransmissor dopamina (MARCOS et al., 2016). A Tyr é precursora da dopamina, da noradrenalina (ou norepinefrina) e da adrenalina (ou epinefrina). Devido à produção destes neurotransmissores, a Tyr é um dos aminoácidos responsáveis por reduzir o estresse em humanos (BANDERET; LIEBERMAN, 1989). Também é derivada da tirosina a melanina, o pigmento da pele e dos cabelos (NELSON; COX, 2002).

A tirosinemia tipo I é um erro inato do catabolismo da tirosina, é uma doença herdada que causa falência hepática, crises de dor neuropáticas, raquitismo e que, quando não tratada, pode evoluir para hepatocarcinoma e morte (BITTAR, et al 2010; DE LUCIA et al., 2016). O tratamento é baseado na inibição da nitisinona 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, e na degradação da tirosina combinada com dieta de baixa proteína restrita em tirosina (DE LUCIA et al., 2016). No Brasil, as fórmulas livres de tirosina, utilizadas no tratamento da Tirosinemia tipo I, são de alto custo e somente obtidas através de processos judiciais, e o medicamento nitisinona (NTBC) não é uma medicação registrada pela ANVISA ( BITTAR, et al 2010).

### **2.1.6 Aminoácidos em soluções parenterais, medicamentos e alimentos**

Nutrição parenteral trata-se de uma suplementação suficiente de nutrientes aplicada em grupos de pacientes, tais como pessoas com câncer, com doenças em estado crítico e idosos ou bebês prematuros. Essas soluções parenterais são compostas por mistura de aminoácidos, podendo haver além desses, carboidratos, lipídios, vitaminas e eletrólitos em proporções variáveis para atender às demandas clínicas de cada paciente. Assim, os aminoácidos podem ser administrados separadamente ou em conjunto com os suplementos já mencionados como misturas de nutrição parenteral total (NPT) (UNGER; HOLZGRABE, 2018).

Pacientes gravemente doentes normalmente são internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) para suporte de órgãos vitais, mas a fraqueza adquirida na UTI muitas vezes causa complicações, particularmente em tempos prolongados de internação. Um fator importante na contribuição dessa fraqueza é a perturbação no metabolismo de aminoácidos (GUNST et al., 2018). Os AAs são um dos blocos de construção mais importantes dos tecidos corporais, enzimas e hormônios, sendo indispensáveis para as funções vitais do corpo.

Quando se trata de disfunção metabólica, insuficiente absorção, aumento da demanda nutricional após trauma cirúrgico grave e cuidados médicos de recém-nascidos prematuros, há uma comprovação benéfica para suplementação direcionada ou até mesmo a completa substituição de AAs pela via parenteral de administração (UNGER; HOLZGRABE, 2018). Estudos associam a redução na ingestão de aminoácidos com o resultado adverso em paciente com doenças graves, assim especialistas recomendam a administração de quantidades suficientes de aminoácidos a esses pacientes desde o início da doença (GUNST et al., 2018).

Mostrada a importância desses compostos, entende-se que há uma necessidade de formulações disponíveis, prontas para uso e seguras, cuja qualidade tem de ser garantida do ponto de vista farmacêutico, considerando parâmetros como pureza de cada ingrediente, concentração, estabilidade, compatibilidade e possíveis degradações (UNGER; HOLZGRABE, 2018).

O desenvolvimento de indicadores precisos para caracterizar o componente proteico em produtos alimentícios convencionais, novos alimentos ou suplementos proteicos é discutido ativamente por pesquisadores da área, sendo a composição de AAs o critério mais importante que revela a qualidade da proteína. O uso correto de AAs em dietas saudáveis, preventivas e/ou curativas requer conhecimento sobre o conteúdo de AAs nos alimentos, seu metabolismo e uso como suplementos alimentares para apoiar estado nutricional humano saudável, bem como produtos terapêuticos administrados no decorrer do tratamento de várias doenças (RIBAROVA, 2018).

Os medicamentos específicos contendo acetilmetionina e/ou metionina são definidos pela ANVISA como hepatoprotetores e são medicamentos isentos de prescrição médica (ANVISA, 2016), indicados no tratamento dos distúrbios metabólicos hepáticos. Tais medicamentos são geralmente vendidos comercialmente em flaconetes de 10 mL contendo associação de aminoácidos em que a metionina está na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

A portaria da ANVISA nº 222, de 24 de março de 1998 indica que a composição de aminoácidos em proteínas de boa qualidade é da ordem de mg g<sup>-1</sup> de proteína pura. O anexo A dessa resolução descreve que a composição dos cinco aminoácidos de interesse do presente estudo varia de 17 a 93 mg g<sup>-1</sup> em ovo, de 14 a 102mg g<sup>-1</sup> em leite de vaca e de 12 a 80mg g<sup>-1</sup> em carne bovina (ANVISA, 1998).

## 2.2 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A quantificação de AAs em diversas matrizes é principalmente baseada em técnicas cromatográficas. Os métodos geralmente utilizados fazem uso as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”), Eletroforese Capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”) e Cromatografia Gasosa (GC, do inglês “*Gas Chromatography*”) (MANIG et al., 2017).

Para a determinação dos AAs previstos neste estudo, Phe, His, Met, Tyr e Trp, existem várias técnicas analíticas descritas na literatura. Dentre estas pode-se destacar HPLC-ESI-MS (ZHENG et al., 2015), HPLC-ESI-MS-MS (ZOPPA et al., 2006), HPLC-UV(CHECA-MORENO et al., 2008), GC-MS (DAUNER; SAUER, 2000; PERSSON; NÄSHOLM, 2001), CE-UV (HAN; CHEN, 2007; XU et al., 2015).

Os métodos empregando as técnicas analíticas citadas apresentam separações que envolvem tempos longos de separação, pois envolvem a análise de vários AAs. Além disso, em alguns casos é necessário uso de reações de derivatização para tornar possível a análise. Outra questão que deve ser levantada nos métodos cromatográficos é o custo de aquisição de colunas para as separações e também custos relacionados às fases móveis empregadas nestes métodos, como solventes orgânicos ou gases de elevada pureza. Neste contexto a CE é uma técnica analítica que traz vantagens em termos de custos dos métodos, com uso de colunas capilares de menor custo se comparadas às colunas cromatográficas, consumo de reagentes e solventes na ordem de poucos mL, conseqüentemente geração de pequena quantidade de resíduos, entre outras. Sendo assim, a CE é uma técnica que apresenta características referentes às normas da química verde (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Além disso, a CE permite desenvolvimento de métodos rápidos de separação (VAZ et al., 2015) o que constitui em uma vantagem especialmente quando um grande número de amostras precisa ser analisado.

## 2.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS

Uma questão importante quando se trata da análise de AAs em alimentos é a necessidade de preparo das amostras, pois grande parte das vezes os aminoácidos encontram-se na forma polipeptídica. Para tal, primeiramente deve-se realizar a moagem e desengorduramento em algumas matrizes. A seguir, para que os aminoácidos sejam obtidos é necessária a realização de hidrólise (ácida e básica) e em alguns casos, previamente a etapa de oxidação (DE ARAÚJO; DE ASSIS JR; SOBREIRA, 2007).

A hidrólise ácida é recomendada para a determinação de grande parte dos aminoácidos, exceto o Trp, que é degradado em condições de baixo pH, sendo, neste caso, recomendada a hidrólise básica (DE ARAÚJO; DE ASSIS JR; SOBREIRA, 2007). Porém, conforme descrito por MURAMOTO; KAMIYA, 1990, a adição de fenol a 3% (m/v) a HCl  $6,0 \text{ mol L}^{-1}$  impede a decomposição de triptofano durante a hidrólise a  $166 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 25 min ou a  $145 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 h, sendo de grande valor para análise de AAs.

Na hidrólise ácida geralmente faz-se o uso de HC  $16,0 \text{ mol L}^{-1}$ , coloca-se a amostra na estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. A hidrólise básica é ideal para o Trp, pois em maiores valores de pH, este analito possui uma boa estabilidade durante o processo. Nesse tipo de hidrólise, utiliza-se NaOH ou LiOH  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  e coloca-se a amostra em uma estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 22 h (DE ARAÚJO; DE ASSIS JR; SOBREIRA, 2007).

Geralmente após a hidrólise é necessário ajuste de pH, diluição (ZHANG et al., 2009) antes de proceder a injeção utilizando a técnica analítica escolhida. Em alguns casos, após as reações de hidrólise, também há a necessidade de derivatização dos aminoácidos.

## 2.4 ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A palavra eletroforese tem sua origem no idioma grego em que *electro* significa eletricidade, e *phoresis*, transporte (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Dessa forma, eletroforese trata-se de uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico (TAVARES, 1995).

A técnica de eletroforese foi desenvolvida inicialmente em 1930 pelo químico ArneTiselius com a finalidade de detectar “*boundaires*” nas proteínas. Nesse trabalho

pioneiro, que foi sendo aprimorado nos anos seguintes, o equipamento proposto por Tiselius provocou um grande avanço no estudo de misturas complexas de proteínas, proporcionando a técnica como ferramenta de separação desses compostos. Os constantes estudos na área e o trabalho com proteínas em soro possibilitaram a esse pesquisador o prêmio Nobel de Química de 1948 (“HOMENS E INSTITUIÇÕES - Prêmios Nobel de 1948”, 2010).

Com o passar dos anos, houve aperfeiçoamentos da técnica a fim de obter maior eficiência e diminuição dos efeitos térmicos de interferência (efeito Joule) provenientes da aplicação de um campo elétrico (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Embora em 1967, outro pesquisador sueco, Stellan Hjertén, tenha realizado os primeiros estudos envolvendo separações eletroforéticas em tubos capilares, que permitiu o início da CE, a técnica apenas se tornou reconhecida após 1980 (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). O uso de capilares de sílica fundida, com diâmetro interno da ordem de 100  $\mu\text{m}$ , cujo revestimento externo foi constituído por poliimida, um polímero que proporciona maior resistência, permitiu o desenvolvimento do equipamento de CE mais moderno (TAGLIARO et al., 1998). Esse sistema desenvolvido por JORGENSON; LUKACS, 1981 suportava tensões aplicadas de até 30 kV, e por utilizar capilares com diâmetro interno reduzido (75  $\mu\text{m}$ ), permitia a dissipação eficiente do calor gerado pelo uso de altas tensões, diminuição dos efeitos térmicos. Ainda assim, somente em 1989 a instrumentação começou a ser comercializada (TAGLIARO et al., 1998).

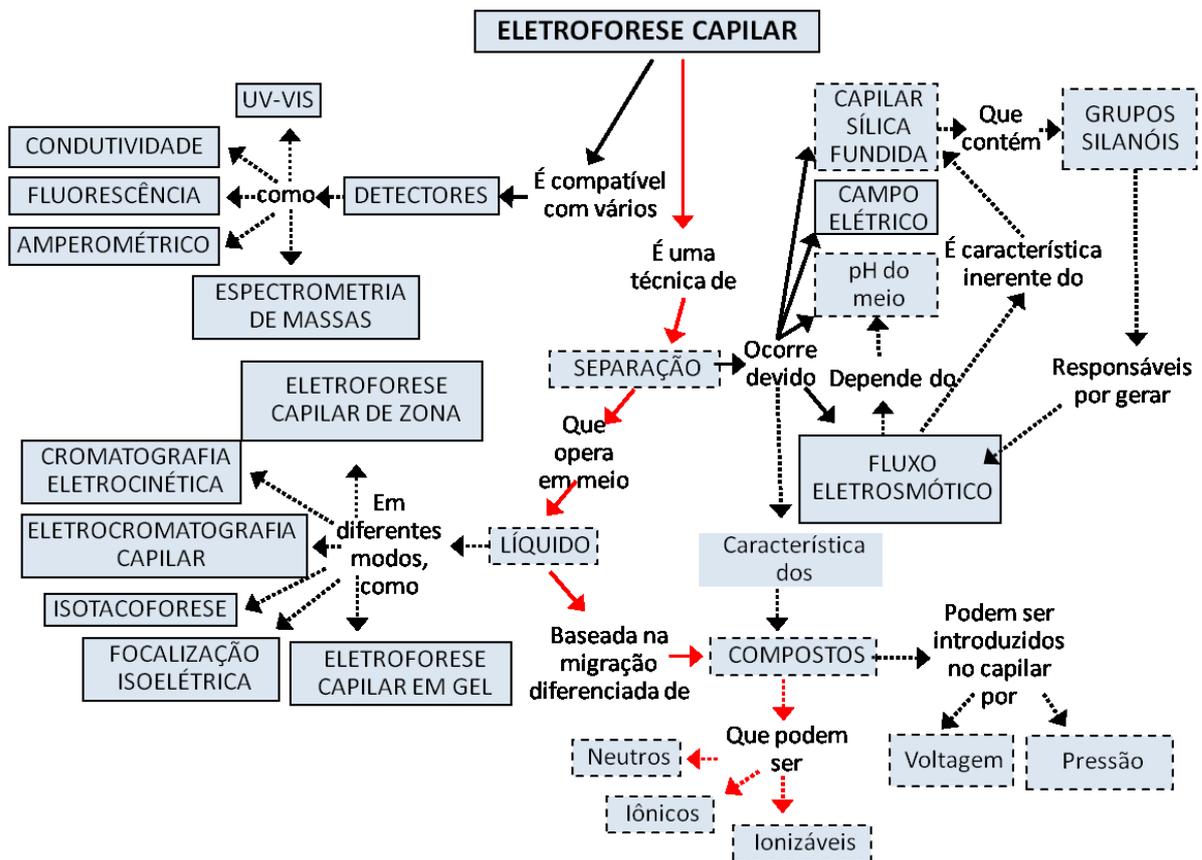
Neste contexto a CE é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos, que podem ser neutros, iônicos ou ionizáveis (VAZ et al., 2015). A Figura 2 apresenta as considerações gerais da CE, tornando mais fácil a compreensão das características envolvidas pela técnica.

Em CE existem dois tipos de injeção (hidrodinâmica e eletrocínética), e difere de outras técnicas cromatográficas, pois a amostra não é propriamente injetada e sim introduzida no capilar, geralmente pelo lado mais distante do detector. Apesar de não ocorrer de fato uma “injeção”, esse termo é comumente usado (DA SILVA, 2012). Os volumes típicos de injeção são da ordem de nL. As amostras podem ser introduzidas por injeção hidrodinâmica, modo mais utilizado, que ocorre aplicando-se uma diferença de pressão que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar. O outro modo é chamado injeção eletrocínética ou

eletromigração, em que a introdução da amostra é feita por aplicação de uma diferença de potencial (DA SILVA, 2012; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A separação em CE possibilita diversos modos de operação, dentre estes pode-se citar a Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC, do inglês, “*Micellar Electrokinetic Chromatography*”), a Eletroforese Capilar em Gel (CGE, do inglês, “*Capillary Gel Electrophoresis*”), a Cromatografia Eletrocinética (EKC, do inglês, “*Eletrokinetic Chromatography*”), a Isotacoforese Capilar (CITP, do inglês, “*Capillary Isotachopheresis*”) e Eletroforese Capilar de Zona (CZE, do inglês, “*Capillary Zone Electrophoresis*”) (TAGLIARO et al., 1998; TAVARES, 1995), esse último modo utilizado nesse trabalho.

Figura 2 - Esquema abordando as considerações gerais da eletroforese capilar.



Fonte: Adaptado de (VAZ et al., 2015)

### 2.4.1 Técnica de Eletroforese Capilar de Zona

A CZE é o modo de operação mais comum e mais utilizado em CE (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; WIEDERSCHAIN, 2008). Seu funcionamento se dá com a injeção da amostra dentro da coluna capilar previamente preenchida com o eletrólito de corrida (BGE, do inglês, “*Background Electrolyte*”), um campo elétrico é gerado devido à aplicação de potencial, ocasionando a migração das espécies em diferentes zonas no interior do capilar. Assim, as espécies são separadas conforme as diferentes mobilidades efetivas, que resultam da combinação de mobilidades eletroforéticas (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012), parâmetro intrínseco de cada soluto, e mobilidade eletrosmótica, característico do fluxo. Este é o único modo de operação que permite a simulação completa utilizando o software *Peakmaster*<sup>®</sup> (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012), ferramenta muito útil em que inserindo dados a serem utilizados na análise é possível visualizar a separação dos compostos, se tornando importante uma vez que minimiza o número de experimentos no equipamento.

### 2.4.2 Software *Peakmaster*<sup>®</sup>

O software *Peakmaster*<sup>®</sup> foi desenvolvido em 2000 por Gas e colaboradores. Trata-se de um software livre e gratuito usado como ferramenta auxiliar para simulação de análise e desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar (JAROŠ et al., 2002). Entre todos os modos de separação, o único que é possível simular completamente a separação é o modo CZE (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

O *Peakmaster*<sup>®</sup> se mostra de uma forma simples ao usuário, permitindo uma inspeção fácil e rápida do comportamento dos analitos em um determinado BGE (JAROŠ et al., 2002). O software possui um banco de dados de muitos íons, com valores tabelados para uma variedade de compostos, que podem ser selecionados dentro do programa. Ao inserir as condições experimentais que se deseja utilizar, como a composição e concentração do BGE, dos analitos, o tamanho do capilar e outros parâmetros, o software calcula características do BGE: pH, força iônica, condutividade, capacidade tampão ou concentrações das formas iônicas individuais dos constituintes do BGE; calcula características eletroforéticas dos analitos: mobilidade efetiva, tendência à dispersão (EMD), sinais em detecção direta ou

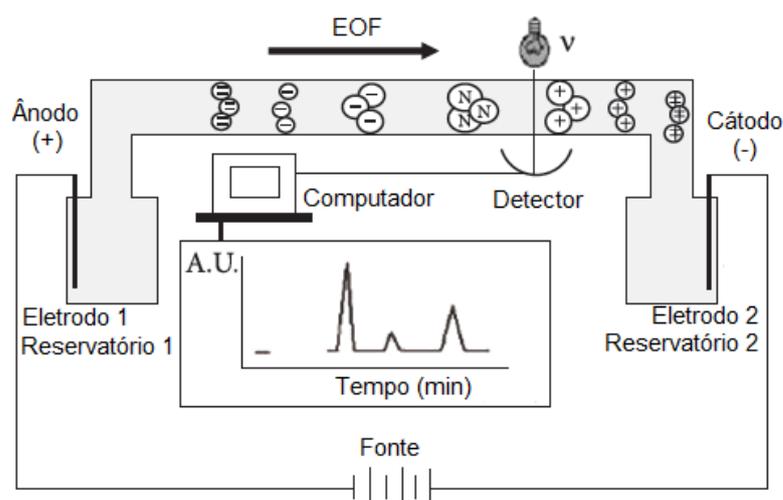
detecção de condutividade ou detecção indireta de UV; Simula eletroferogramas de uma determinada mistura de analitos, mostrando os tempos de migração para cada analito. É possível observar mudanças no eletroferograma através da modificação dos parâmetros do BGE(JAROŠ et al., 2002; JOHNS et al., 2009).

Devido a estas particularidades, o software *Peakmaster*<sup>®</sup> torna-se uma ferramenta útil na otimização dos parâmetros necessários à obtenção de separações adequadas (MANOEL, 2011). Além de proporcionar redução de tempo, materiais, reagentes e desgaste do equipamento, que seriam destinados às tentativas experimentais que são previamente simuladas no software.

### 2.4.3 Instrumentação básica da eletroforese capilar

A Figura 3 mostra uma representação simples da instrumentação da CE, cujo sistema engloba fonte de alta tensão, capilar, eletrodos, reservatórios de solução de BGE e amostra, detector e computador (TAVARES, 1995). O capilar é preenchido com uma solução tampão (BGE) e suas extremidades são mergulhadas em recipientes, que contém essa solução. É aplicado um campo elétrico, gerando corrente no interior do capilar. Os eletrodos também são mergulhados na solução. O capilar passa através de um detector (DA SILVA, 2012), cujo sinal é identificado no computador acoplado ao sistema.

Figura 3 - Esquema de instrumentação básica da Eletroforese Capilar



Fonte: adaptado de (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012)

Os capilares geralmente utilizados são compostos internamente de sílica fundida, com revestimento externo de poliimida. Porém, a superfície interna pode ser modificada com uso de polímeros, biopolímeros, modificadores que alteram o perfil de mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF) em função do pH, se comparado ao capilar de sílica fundida, ocasionando em alguns casos redução do tempo de análise (VITALI, 2012). Para que haja a detecção, no local da fenda do detector óptico, o capilar precisa ser opticamente transparente (TAGLIARO et al., 1998). Para isso, através da remoção de uma pequena porção específica do recobrimento externo forma-se a janela de detecção, que é alinhada ao centro óptico do detector (SILVA, 2017; TAGLIARO et al., 1998).

Um dos benefícios da técnica também é o fato de ser compatível com diversos tipos de detectores (HELLER, 2010). Assim como na cromatografia líquida de alta eficiência, o detector mais utilizado em CE é o de absorvância no ultravioleta/visível (UV-Vis) (DA SILVA, 2012; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012), pois é versátil, possui baixo custo e atende a uma gama de substâncias de interesse (HELLER, 2010). A detecção em CE também pode ser realizada por detector de fluorescência, amperométrico, condutométrico e espectrômetro de massas (MS). Este último é considerado um detector universal e altamente seletivo (DA SILVA, 2012; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Na CE utilizando detecção por UV-Vis, existem ainda duas possibilidades: detecção direta ou indireta. A primeira é utilizada quando as espécies a serem determinadas apresentam absorção na região do ultravioleta e/ou visível, utilizando como BGE compostos que não apresentam absorção nessa região. O modo de detecção indireto é aplicado para analitos que não apresentam absorção no UV-Vis, ou cuja absorção é pouco intensa, utilizando nesse caso, um cromóforo no eletrólito de separação (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; TAGLIARO et al., 1998).

## 2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O objetivo de qualquer medida analítica é obter dados precisos, confiáveis e consistentes que reproduzam os valores de referência. Estas propriedades podem ser avaliadas pelos resultados obtidos através da validação do método. Métodos e técnicas analíticas estão

constantemente em mudanças e melhorias, cada método analítico tem suas próprias características. (RUIZ-ANGEL et al., 2014).

A validação de um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições, por exemplo, para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Diversas definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se, portanto, de um termo não-específico. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (BRITO et al., 2003). Existem vários protocolos de validação de métodos analíticos, entre estes EURACHEM, INMETRO, MAPA, ANVISA (BETTA, 2014).

O ICH define que o objetivo da validação é demonstrar que o procedimento é adequado para o fim a que se destina. Consiste em um somatório das características aplicáveis à identificação, controle de impurezas e procedimentos de ensaios. Entre os parâmetros a serem considerados para validação do método estão: exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária), especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho (ICH, 2005).

### **2.5.1 Conformidade do sistema**

O teste de conformidade do sistema baseia-se no conceito de que o equipamento, a eletrônica, as operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal. Os parâmetros de teste de adequação do sistema a serem estabelecidos para um determinado procedimento dependem do tipo de procedimento que está sendo validado (ICH, 2005).

Apesar de alguns protocolos de validação não inserirem este parâmetro, é importante garantir que o desempenho do sistema está apropriado para uso. Para isso, podem ser verificados no mínimo dois dos seguintes parâmetros: fator de retenção ( $k$ ), repetitividade

(avaliada pelo coeficiente de variação - CV), resolução (Rs), fator de alargamento (TF) e número de pratos da coluna (N) (RIBANI et al., 2004).

### **2.5.2 Seletividade – Especificidade**

Especificidade é a capacidade do método para medir apenas o que é destinado a medir (SHAH et al., 1992), é a capacidade de avaliar inequivocamente o analito na presença de componentes que possam estar presentes, como impurezas, degradantes, matriz, etc. (ICH, 2005).

Alguns autores ainda consideram a diferença entre os dois termos especificidade e seletividade. Especificidade é referida a um método que só dá resposta para um único analito, enquanto seletividade se refere a um método que dá respostas para um número de compostos químicos, que podem ou não ser distinguidos um do outro (BOQUÉ et al., 2002).

### **2.5.3 Linearidade – Faixa de trabalho**

Linearidade de um procedimento analítico é a capacidade de, dentro de um intervalo especificado, demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito na amostra (ICH, 2005).

A linearidade de um método analítico deve ser avaliada pela construção de um gráfico do sinal em função da concentração, chamado curva de calibração. Se houver uma relação linear, verificada com os cálculos de regressão linear, os resultados dos testes devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados (ICH, 2005).

Além da regressão linear, geralmente são verificados o coeficiente de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ), que demonstram a estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 são esses valores, menor é a dispersão do conjunto de dados experimentais, assim como a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004)

O gráfico de resíduos deve ser incluído, pois representa as diferenças entre o valor real de  $y$  e o valor de  $y$  predito a partir da curva de regressão, para cada valor de  $x$ . Se os valores residuais, calculados por regressão linear simples, forem distribuídos aleatoriamente

sobre a linha de regressão, a linearidade é confirmada, enquanto as tendências sistemáticas indicam não-linearidade. A linearidade não pode ser expressa, mas deve ser demonstrada (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). Para a verificação da linearidade do método o ICH recomenda um mínimo de cinco níveis de concentração.

O intervalo do método analítico (faixa de trabalho) corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear (BRITO et al., 2003).

Alguns intervalos mínimos específicos devem ser considerados, como por exemplo, para o ensaio de uma substância medicamentosa ou de um produto acabado, no caso de medicamento, normalmente a faixa de trabalho a ser utilizada é de 80 a 120% da concentração do teste (ICH, 2005).

#### **2.5.4 Exatidão**

A exatidão de um procedimento analítico é definida como sendo a concordância, a proximidade entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007).

Vários métodos para determinar a exatidão estão disponíveis. De acordo com os protocolos do ICH, a exatidão deve ser avaliada usando um mínimo de 9 determinações em um mínimo de 3 níveis de concentração abrangendo o intervalo especificado. Deve ser expressa como a recuperação percentual pelo ensaio da quantidade adicionada conhecida de analito na amostra ou como a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito junto com os intervalos de confiança (ICH, 2005).

#### **2.5.5 Precisão**

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade da concordância, ou seja, avalia o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragens

múltiplas da mesma amostra homogênea sob as condições prescritas. A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2005). Em todos os casos é geralmente expressa como a variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medições (ANVISA, 2011; ICH, 2005).

#### 2.5.5.1 Repetibilidade

Repetibilidade ou precisão intraensaio, avalia a concordância entre os resultados sob as mesmas condições de operação (com o mesmo analista e mesma instrumentação) dentro de um curto período de tempo (ANVISA, 2011; ICH, 2005).

De acordo com as recomendações do ICH, a repetibilidade deve ser avaliada usando um mínimo de 9 determinações abrangendo a faixa de trabalho ou um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

#### 2.5.5.2 Precisão Intermediária

Precisão intermediária ou precisão interensaio expressa variações dentro do mesmo laboratório, porém realizadas em dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc., isto é, trata da concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em diferentes situações (ANVISA, 2011; ICH, 2005). A medida na qual a precisão intermediária deve ser estabelecida depende do objetivo do uso do procedimento. O interessado no método deve estabelecer os efeitos de eventos aleatórios na precisão do procedimento analítico. As variações típicas estudadas incluem dias, analistas, equipamentos, sendo necessário estudar esses efeitos individualmente (ICH, 2005).

#### 2.5.5.3 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial analisa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, através de estudos colaborativos (ANVISA, 2011; ICH, 2005).

### 2.5.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005; WÄTZIG, 2008).

Já o limite de quantificação é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas (ICH, 2005; WÄTZIG, 2008).

Há diferentes formas para determinação desses limites. Entre essas, destaca-se a determinação através da razão sinal-ruído, que é realizada por comparação de sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas de analito com um branco, estabelecendo a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado de forma confiável. Uma razão sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção. Para o limite de quantificação, uma razão sinal-ruído típica é de 10:1 (ICH, 2005).

Outra abordagem para expressar o LD e o LQ através das equações mostradas a seguir.

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

Em que  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva de calibração. A estimativa de  $\sigma$  pode ser realizado com base no desvio padrão do branco, ou ainda baseado na curva de calibração (ICH, 2005).

### 2.5.7 Robustez

Robustez, também chamada de solidez de um método é testada, pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das consequências (DE OLIVEIRA, 2012). A robustez de um método pode ser estimada variando-se os parâmetros analíticos e comparando a precisão obtida em cada determinação (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

O ICH define a robustez de um procedimento analítico como uma medida de sua capacidade de permanecer sem ser afetado quando exposto a pequenas variações nos

parâmetros do método, fornecendo uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (ICH, 2005). Entre alguns exemplos típicos de variações utilizadas para estimar a robustez estão: influência das variações de pH e composição da fase móvel, uso de diferentes colunas e variação da temperatura, no caso de análises por cromatografia líquida.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SOFTWARES

Como ferramenta auxiliar no desenvolvimento do método de separação dos aminoácidos em estudo, foi utilizado o *software Peakmaster*<sup>®</sup> versão 5.3, a fim de simular as condições do método por CZE para uma separação adequada dos AAs.

Nas análises experimentais, o controle, a aquisição e o tratamento dos dados foram conduzidos com o *software ChemStation*<sup>®</sup> (Agilent).

O tratamento de dados também foi realizado utilizando o *software Microsoft Excel*<sup>®</sup> 2010 (Microsoft).

#### 3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau e pureza analíticos. No preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água ultra pura, deionizada em sistema Milli-Q (*Millipore*<sup>®</sup>, Bedford, MA, USA), com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C. A solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> utilizada no condicionamento do capilar foi preparada a partir de hidróxido de sódio micropérolas P.A (Vetec, Brasil), assim como a solução de NaOH 50mmol L<sup>-1</sup> utilizada como diluente na solução estoque de padrões. Para o BGE, foram preparadas soluções estoque de Butilamina (*Merck*<sup>®</sup>, Brasil) e de MOPS, ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico (*Sigma Aldrich*<sup>®</sup>, Brasil), ambas na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup>.

A solução padrão estoque contendo os cinco analitos de interesse (fenilalanina, histidina, metionina, tirosina e triptofano) com concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>, foi preparada utilizando padrões (*Sigma Aldrich*<sup>®</sup>, Brasil), tendo como diluente NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>. Assim como, uma solução estoque aquosa do padrão interno, ácido *p*-tolueno sulfônico monohidratado (*Merck*<sup>®</sup>, Brasil), foi preparada na mesma concentração dos analitos (1000 mg L<sup>-1</sup>).

Todas as soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração. A cada uso, as mesmas foram utilizadas ao atingir temperatura ambiente de cerca de 20 °C.

Para a hidrólise ácida foi preparada solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> a partir de HCl 37 % m/m (*Dinâmica*<sup>®</sup>, *Brasil*). Para a etapa seguinte de neutralização /precipitação foi feita síntese de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a partir da mistura estequiométrica de AgNO<sub>3</sub> P.A. (*Plat-Lab, Brasil*) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro P.A. (*Synth*<sup>®</sup>, *Brasil*) seguida de secagem em estufa a 40 °C por 2 h.

Na hidrólise básica foi preparada solução de LiOH 4,0 mol L<sup>-1</sup>, a partir de LIOH P.A. (*Chemical, Brasil*), a neutralização/precipitação foi realizada com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% m/m (*Vetec*<sup>®</sup>, *Brasil*).

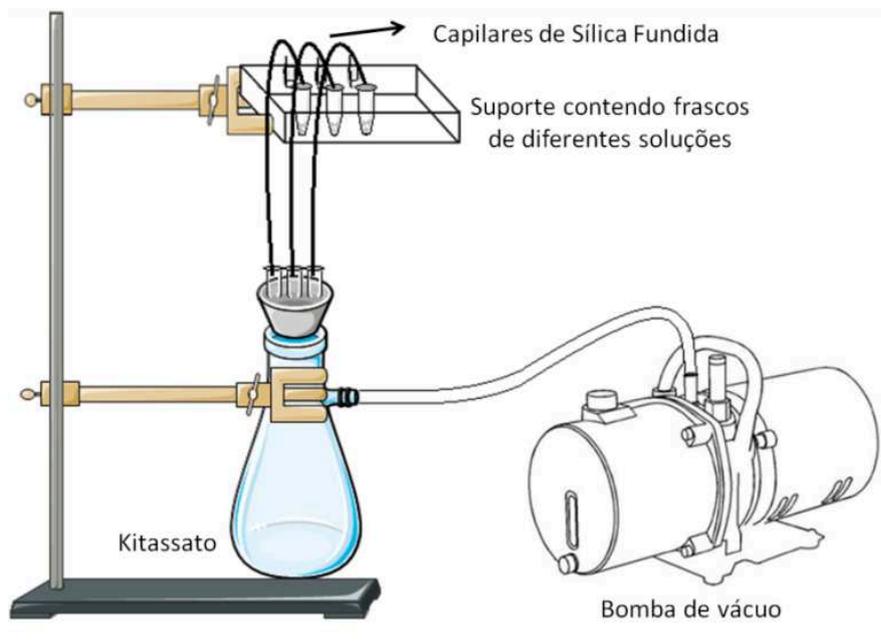
### 3.3 CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO

#### 3.3.1 Coluna capilar

O capilar utilizado foi de sílica fundida, com revestimento externo de poliacrilato, comprimento total de 48,5 cm e 40,0 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno (DI), provenientes da empresa Microtube (Araraquara, SP, Brasil).

O condicionamento do capilar foi realizado em um sistema externo ao equipamento de eletroforese capilar, descrito por (VITALI, 2012), que permite economia de tempo de uso do equipamento de CE, em especial da bomba de pressão, o que por consequência causa o aumento no tempo de vida útil de componente. Além de proporcionar economia de tempo e facilitar a etapa de condicionamento do capilar, uma vez que possibilita o condicionamento de vários capilares simultaneamente. Tal sistema representado na Figura 4 é constituído por uma bomba de vácuo conectada a um frasco tipo Kitassato, cujos capilares são acoplados. O condicionamento é iniciado com solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> durante 40 minutos, seguido de água ultra pura também por 40 minutos, enfim o BGE foi passado durante 15 minutos.

Figura 4 - Esquema representando o sistema utilizado para realizar o condicionamento de capilares fora do equipamento de eletroforese capilar.



Fonte: Adaptado de (VITALI, 2012) com auxílio de ferramentas (“Servier”, 2018)

### 3.3.2 Composição do eletrólito de corrida e parâmetros instrumentais selecionados

Os reagentes que compõem o BGE, assim como suas concentrações foram definidas a partir das prévias simulações realizadas no *software PeakMaster*<sup>®</sup>. As propriedades avaliadas nessas simulações, a fim de encontrar as condições ideais de separação foram: pH ótimo para separação de todos os analitos, capacidade tamponante adequada, força iônica aceitável, baixa dispersão por eletromigração - EMD (do inglês “*Electromigration Dispersion*”) e diferença de mobilidade mínima entre os AAs para promover a separação.

O BGE empregado foi composto por butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11, preparado previamente antes de cada uso a partir das soluções estoque já descritas desses reagentes. As medidas eletroforéticas por CZE foram realizadas em temperatura controlada de  $25^\circ\text{C}$  e aplicando voltagem de 30 kV com polaridade positiva na injeção. A injeção foi conduzida empregando modo hidrodinâmico com 50 mbar de pressão por 7s e a detecção realizada no modo direto em 210 nm.

### 3.3.3 Estabilidade do eletrólito de corrida

Para verificar a estabilidade do BGE, foi avaliado o número de injeções em que o mesmo conserva suas características, como pH e capacidade tamponante, de modo a não causar alteração nos picos e nos tempos de migração entre as diferentes injeções. Para isso, foi utilizada uma solução padrão com os cinco aminoácidos e padrão interno na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , essa solução foi injetada 50 vezes de forma consecutiva, utilizando 7s de tempo de injeção. Ainda foram testados dois diferentes tipos de frascos onde o BGE é mantido durante a corrida, o de plástico com capacidade de  $750 \mu\text{L}$  e o de vidro, capaz de armazenar volumes de até  $1500 \mu\text{L}$ .

### 3.3.4 Seleção do tempo de injeção

A fim de obter o tempo ótimo de injeção da amostra, foi preparada uma solução padrão com os cinco Aas do estudo e padrão interno, todos na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e injetada com tempos de injeção variando de 3s a 40s. Os outros parâmetros já verificados, como pH, composição do BGE se mantiveram nos tempos de injeção testados. A partir dos eletroferogramas obtidos foram avaliadas a altura e a resolução dos sinais referentes aos AAs para cada condição testada. Relacionando a melhor resolução e maior altura de sinal, foi selecionado o tempo de injeção mais adequado ao método. A altura foi considerada, pois quanto maior o tempo de injeção maior será a tendência de que ocorra alargamento do sinal, ou seja, redução da altura e aumento da largura de base, devido a dispersão dos analitos, o que provoca menor eficiência e a separação ineficiente de analitos com tempos de retenção próximos.

## 3.4 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os experimentos de CZE foram realizados utilizando o equipamento de CE modelo Agilent Technologies CE7100 (Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector com arranjo de diodos.

Todas as pesagens foram realizadas em balança Radwag modelo AS-60 com precisão de 1 mg. A verificação do pH foi medida em pHmetro *Sensoglass* modelo SP 1800, com eletrodo de referência de Ag/AgCl, também da *Sensoglass*(Brasil). A homogeneização de todas as soluções foi realizada em banho de ultrassom *Unique*(Brasil), modelo USG-1450A, com frequência de 25 kHz. Para as diluições realizadas em tubos tipo falcon ou tipo eppendorf, foi utilizado agitador de tubos tipo vórtex *Phoenix* (Brasil), modelo AP56, com potência de 130 W.

As amostras de banana foram trituradas em Mixer Philips Walita (Brasil). Na etapa de hidrólise, foi utilizada estufa De Leo & Cia Ltda (Brasil) e centrífuga Quimis (São Paulo, Brasil) modelo Q222T com velocidade máxima de 3400 rpm.

### 3.5 AMOSTRAS

#### 3.5.1 Solução parenteral

As amostras comerciais de solução parenteral foram obtidas através de doação do Hospital Universitário (UFSC). Foram analisadas duas amostras.

Previamente a cada análise, as amostras foram homogeneizadas em sua embalagem original, diluídas obtendo fator de diluição final de cem vezes, logo após adicionadas de padrão interno, cuja concentração final foi de 30,0 mg L<sup>-1</sup>, a fim de obter concentração de cada AA estudado na faixa de trabalho da curva de calibração preparada. A determinação foi realizada com triplicata de preparo e de injeção para cada amostra.

#### 3.5.2 Medicamento contendo metionina

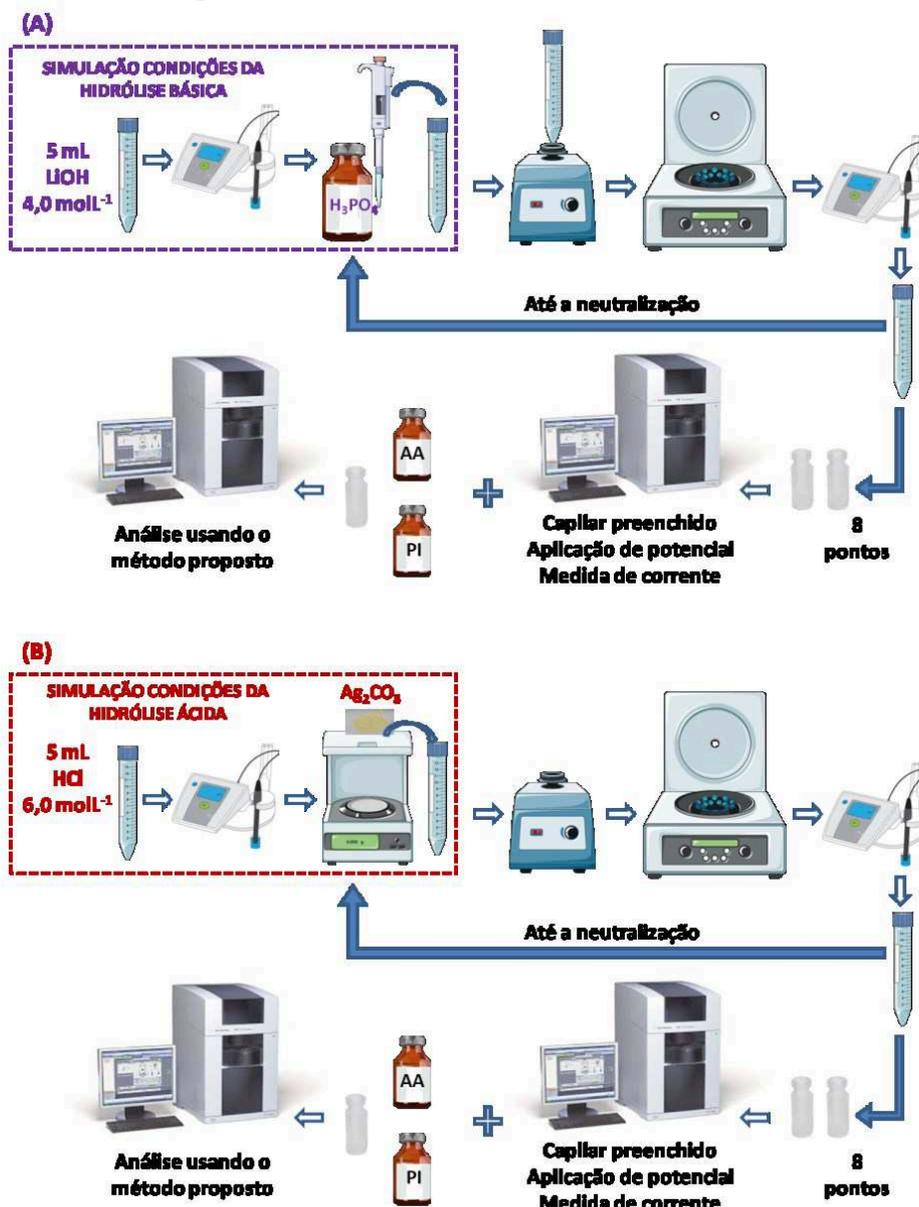
As amostras de medicamentos foram adquiridas em comércio local (farmácias) do município de Florianópolis/SC, considerando o medicamento referência e genéricos.

O preparo e o fator de diluição das amostras de medicamentos seguiram o mesmo procedimento das amostras de solução parenteral. Foram analisadas três amostras de diferentes marcas. A determinação foi realizada com triplicata de preparo e de injeção para cada amostra.

### 3.5.3 Preparo de amostra de banana

A fim de verificar o perfil do eletroferograma em diferentes condições de pH e força iônica, cada uma das soluções a ser utilizada nas hidrólises básica e ácida ( $\text{LiOH } 4,0 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{HCl } 6,0 \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente) foram submetidas a etapa de neutralização/precipitação, realizando procedimento ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma dos experimentos para verificar o perfil do eletroferograma em diferentes condições de pH. (A) Hidrólise básica; (B) Hidrólise ácida.



Fonte: próprio autor com auxílio de ferramentas ("Servier", 2018)

Para isso, em tubos tipo falcon contendo  $\text{LiOH}$   $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados certos volumes de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% m/m. Nos tubos contendo 5 mL de  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ , foram adicionadas determinadas massas de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ . A cada adição, em ambas as simulações de hidrólises (básica e ácida), o conteúdo do tubo foi novamente homogeneizado, centrifugado e realizada medida de pH, totalizando 8 pontos de adição em cada uma das soluções. Aliquotas de cada um desses pontos foram separadas em dois vials utilizados para preenchimento do capilar com *flush* durante 60s. Após ter o capilar preenchido com a solução, foi aplicado 1 kV de potencial por 30s e realizada a medida corrente. Em cada um dos pontos, foi adicionado padrão e realizada imediatamente análise em equipamento de eletroforese capilar utilizando os mesmos parâmetros experimentais já descritos.

Após verificar o pH em que o perfil do eletroferograma se mostrou melhor, foram realizadas as hidrólises ácida e básica em banana. As amostras de banana branca foram adquiridas em comércio local (mercado) do município de Florianópolis/SC.

As hidrólises foram baseadas nas recomendações utilizadas atualmente pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), conforme protocolo descrito por (SPITZ, 1973), com modificações a partir da etapa de neutralização. O preparo para análise em amostra de banana iniciou com a trituração da fruta sem a casca e imediatamente foi feita a pesagem (duplicata) de 3,0g em tubos de hidrólise, adicionados 10 mL  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ , para hidrólise ácida e 10 mL de  $\text{LiOH}$   $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ , para hidrólise básica. Após a mistura do conteúdo de cada tubo, o mesmo foi imerso em recipiente contendo sílica gel, no interior da estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde foi mantido por 22h. O mesmo procedimento foi realizado para uma solução contendo padrões dos aminoácidos e contendo banana e padrões.

Passado o tempo de hidrólise em estufa, foi novamente homogeneizado o conteúdo do tubo, centrifugado e retirado alíquota de 5 mL para tubo tipo Falcon, onde foram realizadas as adições de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% m/m e  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  para hidrólise básica e ácida, respectivamente. Em cada adição, após a homogeneização e centrifugação foram realizadas as medidas de pH até se obter pH próximo ao esperado identificado nos testes com as soluções, e análise em eletroforese capilar.

### 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação foi realizada seguindo as recomendações da ANVISA, AOAC e ICH, com algumas modificações quanto à faixa de trabalho utilizada. Entre os parâmetros avaliados estão: conformidade do sistema, seletividade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limites de detecção e de quantificação e robustez.

Os experimentos de validação foram conduzidos para três tipos de matriz: soluções parenterais comerciais contendo todos os AAs selecionados, medicamento para o fígado contendo metionina e amostra de banana.

#### 3.6.1 Conformidade do sistema

O teste de conformidade do sistema foi realizado avaliando os seguintes parâmetros: área corrigida de cada sinal (área do analito/área do padrão interno), tempo de migração, resolução e número de pratos. Para isso, foram utilizados cinco níveis de concentração da curva de calibração (5,0 mg L<sup>-1</sup>; 30,0 mg L<sup>-1</sup>; 40,0 mg L<sup>-1</sup>; 60,0 mg L<sup>-1</sup> e 100,0 mg L<sup>-1</sup>), preparados e injetados em triplicata, totalizando nove eletroferogramas de cada nível.

Foi considerado o coeficiente de variação (CV) dessas injeções consecutivas para a avaliação dos dois primeiros parâmetros (área corrigida e tempo de migração), através da Equação 3.

$$CV \% = \frac{\sigma}{M} 100 \quad (3)$$

Onde  $\sigma$  corresponde ao desvio padrão absoluto e M é a média aritmética dos valores de cada parâmetro (área corrigida e tempo de migração). De acordo com o (AOAC, 2016), considera-se adequado CV de até 11%, para amostras com níveis de concentração da ordem de mg L<sup>-1</sup>.

A resolução entre os compostos foi verificada a partir da Equação 4.

$$Rs = 2 \frac{(t_n - t_{n-1})}{(W_n + W_{n-1})} \quad (4)$$

Onde  $Rs$  representa a resolução entre dois picos adjacentes,  $(t_n - t_{n-1})$  é a diferença entre os tempos de migração desses dois picos adjacentes, enquanto  $(W_n + W_{n-1})$  corresponde ao somatório das larguras de base desses picos.

O número de pratos calculados foi verificado através da equação seguinte:

$$N = 16 \frac{t_n^2}{W^2} \quad (5)$$

Onde  $N$  é o número de pratos  $t_n$  corresponde ao tempo de migração do analito em minutos e  $W$  é a largura da base do pico.

Por definição, para cromatografia, considera-se adequados valores de resolução acima de 1,5 (SKOOG et al., 2005) ou 2,0 (RIBANI et al., 2004) e de número de pratos acima de 2000, porém para eletroforese capilar não há valor mínimo especificado para esses parâmetros. Assim, nesse trabalho foram adotados como adequados valores de resolução e número de pratos definidos em cromatografia.

### 3.6.2 Seletividade – Especificidade

A avaliação da seletividade do método foi realizada através da ferramenta do software *ChemStation*<sup>®</sup> que possibilita verificar experimentalmente a pureza do pico. A ferramenta sobrepõe automaticamente uma série de espectros obtidos sob o sinal analítico gerando como resposta um sinal considerado puro ou impuro. Adicionalmente, o software *Peakmaster*<sup>®</sup> foi utilizado para simular variações na composição do BGE, com o objetivo de verificar o efeito dessas variações no perfil de separação dos analitos em estudo.

### 3.6.3 Linearidade – Faixa de trabalho

A linearidade do método foi verificada através da construção de curvas de calibração em nove níveis de concentração, partindo de soluções padrões de AAs, preparadas e injetadas em triplicata, gerando nove resultados para cada nível. A faixa de trabalho estudada foi de 5,0 mg L<sup>-1</sup> a 100mg L<sup>-1</sup>, como total de nove níveis de concentração. As soluções foram preparadas a partir da diluição da solução estoque 1000 mg L<sup>-1</sup>. Os parâmetros das curvas de calibração foram obtidos através de regressão linear. Foram gerados gráficos de resíduos a fim de verificar a presença de *outliers* (valores discrepantes) e aplicado o Teste de Grubbs para confirmação desses valores. Os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5%.

### 3.6.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação de amostras de solução parenteral e de medicamentos fortificadas em cinco níveis de concentração, 5, 10, 20, 30, 40 e 50mg L<sup>-1</sup> injetados em triplicata. Essas concentrações foram escolhidas, pois acima destas, o resultado esperado estaria fora da faixa de trabalho utilizada. Para os cálculos de recuperação das amostras utilizou-se a equação seguinte:

$$Rec(\%) = \frac{Conc_{amostra\ fortificada} - Conc_{amostra\ não\ fortificada}}{Conc_{Adicionada}} \times 100 \quad (6)$$

### 3.6.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada de três maneiras: repetibilidade (precisão intraensaio), precisão intermediária (precisão interensaio) e reprodutibilidade. Nos três casos, foram utilizadas soluções padrão contendo os cinco AAs estudados, em cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata. A concentração do padrão interno utilizada foi de 30,0 mg L<sup>-1</sup> em todos os níveis. O parâmetro considerado para avaliação de todas as formas de precisão foi o CV da área de pico corrigida e do tempo de migração, conforme já descrito na Equação 3.

#### 3.6.5.1 Repetibilidade

Para avaliar a precisão do método através da repetibilidade foram realizadas nove injeções consecutivas das soluções padrão para cada um dos cinco níveis de concentração já citados. Todos os experimentos foram realizados no mesmo dia, com condições experimentais idênticas.

#### 3.6.5.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi determinada através de nove injeções das soluções padrões nos cinco níveis de concentração já mencionados, em dois diferentes dias. Em cada

dia o BGE foi novamente preparado, assim como as soluções padrão e o padrão interno, partindo de suas respectivas soluções estoque.

#### 3.6.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada através das análises nos cinco níveis de concentração estudados na precisão, sendo realizadas em dois diferentes equipamentos, BGE e capilar. Foram realizadas nove injeções de cada nível de concentração e os resultados dessas análises foram comparadas pela avaliação do CV da área corrigida e tempo de migração.

#### 3.6.6 Limites de detecção (LD)

O LD foi obtido de duas formas: usando a razão sinal/ruído, em que o LD do método equivale a três vezes a relação sinal/ruído, e a partir dos parâmetros da curva analítica, aplicando a Equação 1.

#### 3.6.7 Limite de quantificação (LQ)

O LQ foi obtido de duas maneiras, sendo a primeira a partir da relação sinal/ruído, em que o LQ do método é equivalente a dez vezes essa razão. O LQ também foi calculado, utilizando os parâmetros da curva analítica e a Equação 2.

#### 3.6.8 Robustez

A robustez do método foi verificada através da injeção de soluções padrão dos cinco AAs deste estudo, em cinco níveis de concentração, preparados e injetados em triplicata (9 resultados para cada concentração), com concentração constante do padrão interno (30,0 mg L<sup>-1</sup>). As mesmas soluções foram injetadas em duas condições experimentais preparadas propositalmente com pequenas alterações na concentração do BGE (conseqüentemente de pH), além de diferentes colunas capilares, porém provenientes do mesmo fabricante. Tais alterações estão dispostas na Tabela 2.

A robustez foi avaliada através do CV das áreas de pico corrigidas e do tempo de migração, calculado de acordo com a Equação 3.

Tabela 2 - Diferentes condições de pH do BGE para avaliação de robustez. \*A e B são capilares de diferentes marcas

	1ª condição: ideal	2ª condição: variação
pH	11,00	11,25
Capilar*	A	B
Número de eletroferogramas para cada concentração	9	9

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2018).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

#### 4.1.1 Composição do eletrólito de corrida e escolha de pH

Utilizando o software *PeakMaster*<sup>®</sup> é possível verificar as mobilidades eletroforéticas, assim como o pK<sub>a</sub> de todos os compostos envolvidos: analitos, BGE e padrão interno. Esses dados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados de pK<sub>a</sub> e mobilidade eletroforéticas dos aminoácidos do estudo, padrão interno e BGE. Todos os dados foram obtidos do software *Peakmaster*<sup>®</sup>.

Função no método	Composto	pK <sub>a</sub>	Mobilidade eletroforética (x10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> )
Analitos	Triptofano	9,594; 2,310	-25,400; 25,600
	Fenilalanina	9,262; 2,130	-26,900; 27,400
	Histidina	9,330; 6,040; 2,010	-28,300; 26,800; 47,500
	Metionina	9,344; 2,130	-29,300; 29,300
Padrão interno	Ácido <i>p</i> -tolueno sulfônico	-2,000	-31,100
Analito	Tirosina	10,189; 9,099; 2,180	-40,000; -20,000; 26,300
BGE	Butilamina	10,590	37,700
	MOPS	7,200	-26,900

Fonte: Elaborado pelo próprio autor com dados obtidos do software *Peakmaster*<sup>®</sup>.

O método foi desenvolvido utilizando detecção direta, pois os analitos triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina possuem grupos cromóforos em sua estrutura, que são responsáveis pela absorvidade molar desses compostos em determinados comprimentos de onda. Utilizando o mesmo raciocínio, foi selecionado como padrão interno o ácido *p*-tolueno sulfônico, que também apresenta grupo cromóforo e possui absorvidade molar na região de interesse do espectro. Esse composto ainda demonstra outras características

importantes na escolha do padrão interno no que se refere a sua mobilidade, cujo valor se encontra entre os valores de mobilidade de dois dos cinco analitos, além de não estar presente na composição das amostras a serem analisadas. O uso de um padrão interno nas análises se torna essencial para que a exatidão e a precisão do método sejam aperfeiçoadas, pois corrige variações no sinal analítico devido a alterações nas condições de análise.

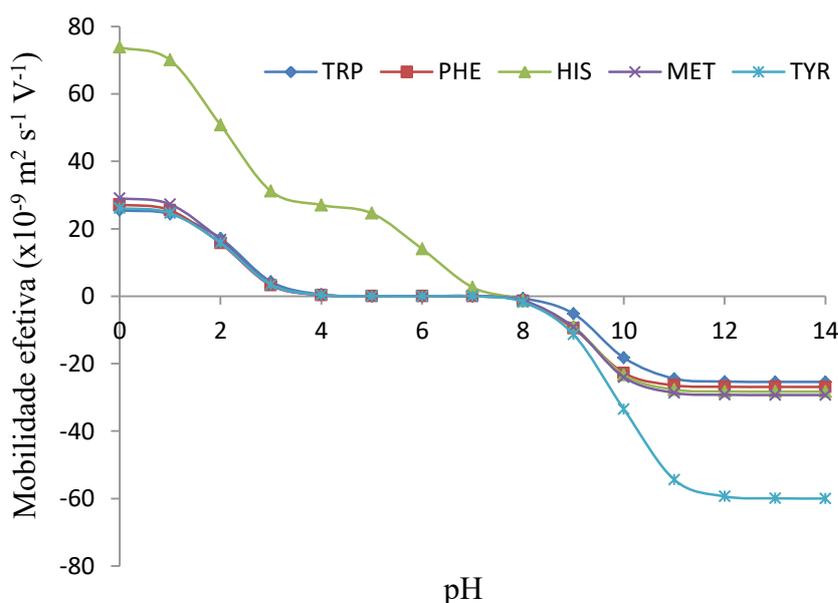
Utilizando os dados dos analitos mostrados na Tabela 3 e aplicando a Equação 7 para espécies aniônicas e a Equação 8 para as espécies catiônicas é possível traçar o gráfico de mobilidade eletroforética *versus* pH, a fim de verificar o pH ideal para que ocorra a separação adequada, demonstrado na Figura 6.

$$(\mu_{eff})_{A^-} = \alpha_{A^-} \mu_{A^-} = \frac{k_2}{k_2 + [H_3O^+]} \mu_{A^-} \quad (7)$$

$$(\mu_{eff})_{B^+} = \alpha_{B^+} \mu_{B^+} = \frac{[H_3O^+]}{k_2 + [H_3O^+]} \mu_{B^+} \quad (8)$$

Onde  $\mu_{eff}$  representa a mobilidade efetiva,  $\mu_{A^-}$  e  $\mu_{B^+}$  é mobilidade eletroforética das espécies  $A^-$  e  $B^+$ , respectivamente, os termos  $\alpha_{A^-}$  e  $\alpha_{B^+}$  representam o grau de ionização das espécies  $A^-$  e  $B^+$ , respectivamente e  $k_a$  a constante de acidez.

Figura 6 - Curvas de mobilidade efetiva dos analitos: triptofano, fenilalanina, histidina, metionina e tirosina em função do pH. Os dados foram obtidos do *software PeakMaster*<sup>®</sup> e compilados no *software Excel*<sup>®</sup> a partir da Equação 7 e Equação 8.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

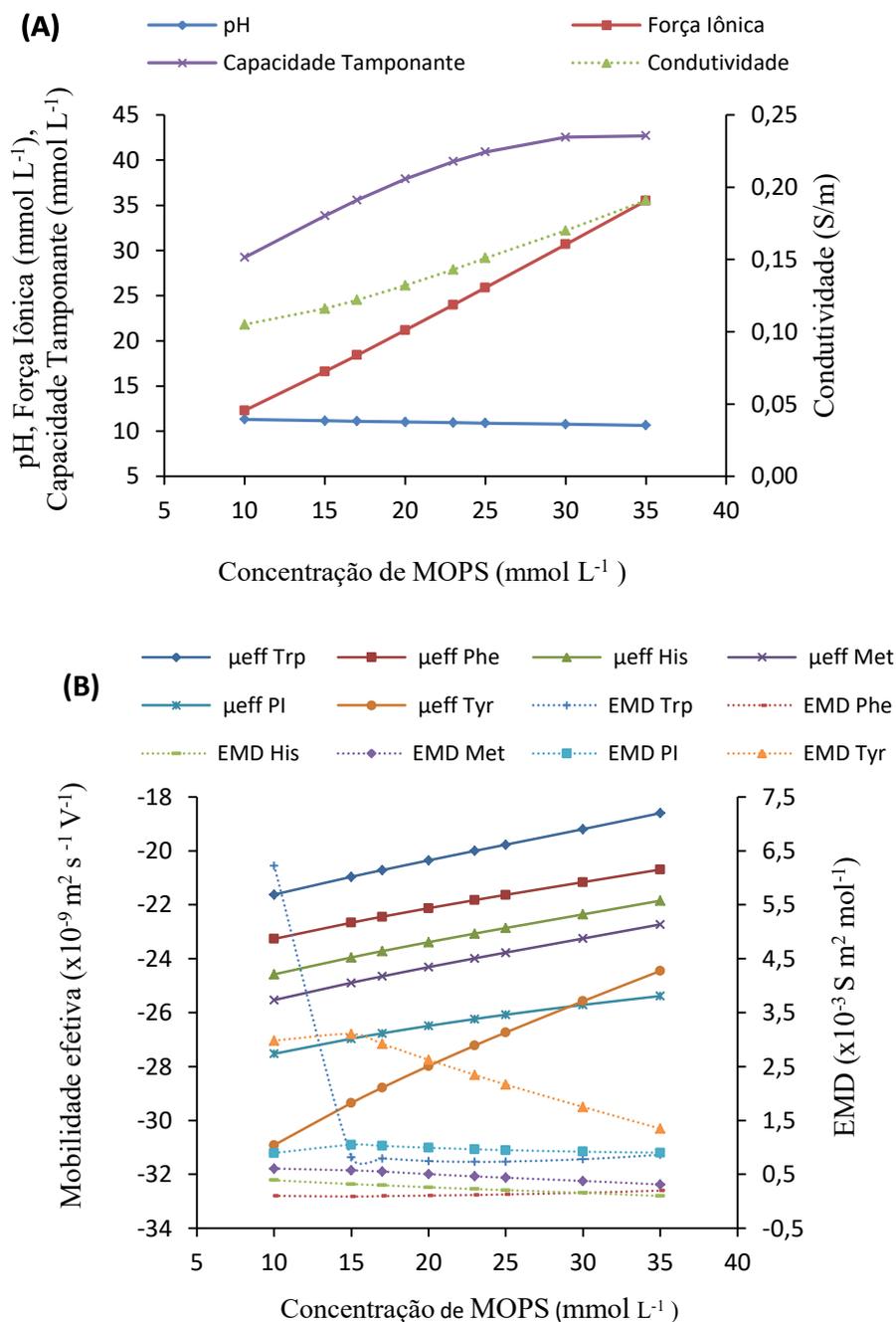
Ao considerar o gráfico de mobilidade *versus* pH representado na Figura 6, é possível verificar que a faixa de pH adequada para a separação está em valores próximos a 11, pois nessa região de pH os analitos encontram-se dissociados e com diferentes mobilidades, possibilitando a separação dos cinco compostos. É importante ressaltar que nessa faixa de pH os aminoácidos encontram-se dissociados, em sua forma aniônica, critério importante para a seleção dos componentes do BGE.

Uma vez que a detecção ocorre de modo direto, os constituintes do BGE devem ter ausência ou baixa absorção na região do UV-Vis. Para compor o BGE, a butilamina foi selecionada considerando o  $pK_a$  (10,590) desse composto que proporciona boa capacidade tamponante ao BGE na faixa de pH indicada. O outro componente do BGE selecionado foi o MOPS, que além de não possuir absorção na região do UV-Vis, tem mobilidade eletroforética aproximada às mobilidades da maioria dos analitos em estudo, o que contribui para a minimização dos efeitos de dispersão por eletromigração (EMD) que causam alargamento e assimetria de picos.

Com a finalidade de obter as melhores concentrações dos compostos do BGE, foram realizadas simulações no *software PeakMaster*<sup>®</sup> e avaliados os parâmetros como pH, EMD, capacidade tamponante, força iônica, condutividade e mobilidade efetiva. Primeiramente, as simulações foram realizadas com a concentração de butilamina fixa em  $35 \text{ mmol L}^{-1}$ , porém por razões de estabilidade do BGE abordadas a seguir, a concentração de butilamina foi fixada em  $70 \text{ mmol L}^{-1}$ , e foram variadas as concentrações de MOPS. Assim somente serão apresentados os dados referentes às simulações com essa concentração de butilamina, que estão dispostos na Figura 7.

As condições ideais para o método devem considerar todos os parâmetros apresentados. Assim, de acordo com os dados das simulações mostrados na Figura 7, conclui-se que as condições ideais do BGE para a completa separação dos analitos e PI são Butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . Tais concentrações foram selecionadas por demonstrar pH adequado já definido anteriormente com valor próximo a 11 (11,01), suficiente capacidade tamponante ( $37,91 \text{ mmol L}^{-1}$ ), valores baixos de EMD, porém não muito próximos, baixa condutividade ( $0,13 \text{ S/m}$ ) e força iônica ( $21,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Figura 7 - Avaliação dos parâmetros da simulação das condições de separação dos AA usando o software *PeakMaster*<sup>®</sup> mantendo concentração fixa de 70 mmol L<sup>-1</sup> de butilamina e variando a concentração de MOPS de 10 mmol L<sup>-1</sup> a 35 mmol L<sup>-1</sup>. (A) Parâmetros do BGE *versus* a concentração de MOPS (pH, força iônica, capacidade tamponante e condutividade). (B) Mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) e dispersão por eletromigração (EMD) *versus* a concentração de MOPS.

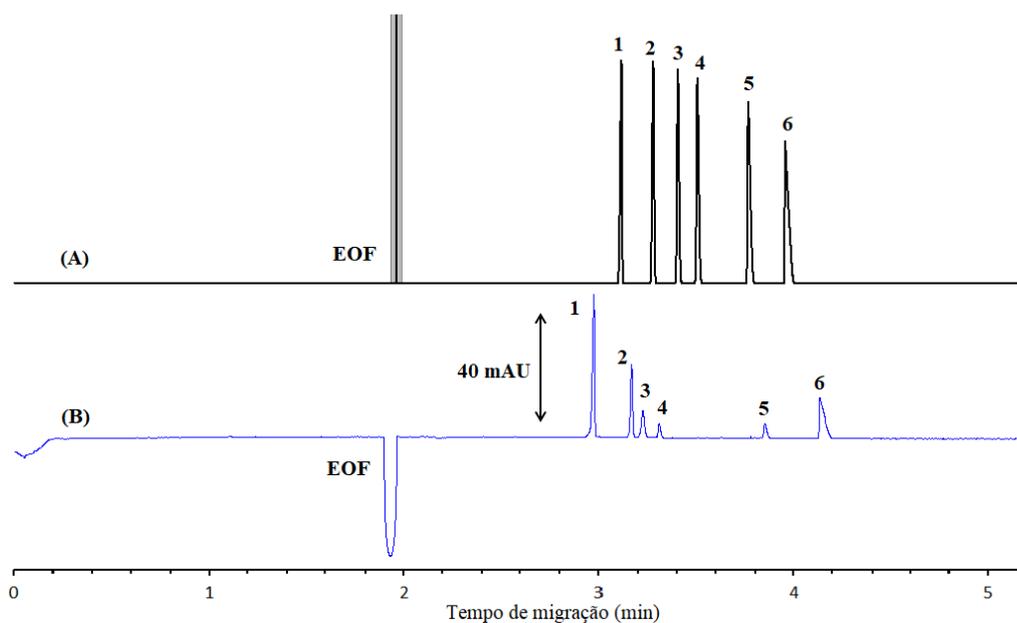


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Esses dois últimos parâmetros são importantes para a redução da geração de calor no capilar, que proporciona o uso de altas tensões para se obter separações com menores tempos de análise, dessa forma prevenindo o efeito Joule provocado pela transformação de energia elétrica em energia térmica.

A Figura 8 apresenta a comparação entre o método simulado e o eletroferograma obtido experimentalmente, utilizando as mesmas condições consideradas ideais para a separação.

Figura 8 - Eletroferogramas empregando as condições de separação selecionadas: (A) simulação com o *software PeakMaster®* e (B) injeção de mistura de padrões dos analitos e padrão interno todos a  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições experimentais: BGE: butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11, injeção  $+30 \text{ kV}$ ,  $50 \text{ mbar}$ ,  $7 \text{ s}$ , capilar de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno, com  $48,5 \text{ cm}$  de comprimento total,  $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo, detecção em  $210 \text{ nm}$ . Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3- His, 4- Met, 5- PI, 6- Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2018).

A partir do exposto na Figura 8 é possível verificar que há boa proximidade entre o eletroferograma simulado e o obtido experimentalmente, atestando que o uso do software de simulação é um aliado no desenvolvimento e otimização de métodos por eletroforese capilar de zona, mostrando-se uma ferramenta útil e confiável, além de oferecer a redução de experimentos nesta etapa de desenvolvimento e confirmar que as condições do método foram escolhidas de maneira correta.

#### 4.1.2 Estabilidade do eletrólito

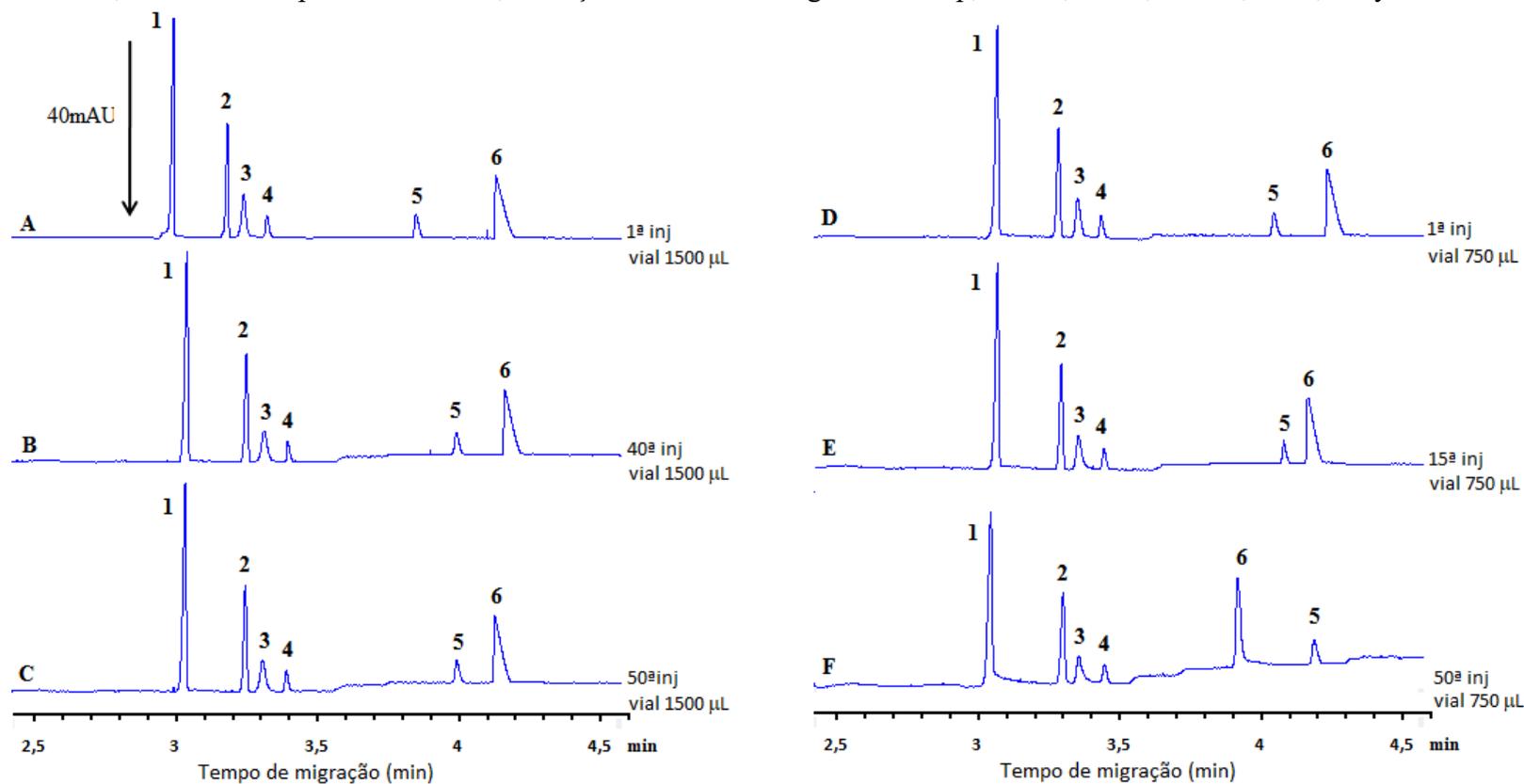
Ao realizar diversas análises consecutivas foram observadas alterações nos tempos de migração dos analitos, afetando a resolução entre os picos e o tempo de análise. Essas características são típicas de mudança de pH durante as corridas, ou seja, o BGE não se mostrou estável a muitas análises consecutivas, perdendo seu efeito tampão.

Nos testes iniciais as concentrações dos componentes do BGE eram de butilamina 35 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 15 mmol L<sup>-1</sup>. Porém, nessa condição verificou-se ser possível realizar cerca de 10 corridas sem alteração do perfil do eletroferograma. Para melhorar essa característica, foram aumentadas as concentrações dos componentes a fim de ter ganho de estabilidade do BGE. Outro artifício utilizado foi dobrar o volume de BGE armazenado nos vials.

Assim, para verificar a estabilidade do BGE composto por butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, uma solução padrão dos analitos e padrão interno, todos na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> foi injetada 50 vezes consecutivas, testando o BGE mantido em diferentes recipientes durante todas as análises: em vial com capacidade de 750 µL, e em segundo momento em vial com capacidade de 1500 µL. A Figura 9 apresenta os eletroferogramas após várias análises comparando o BGE mantido nos dois distintos recipientes.

Conforme visualizado na Figura 9, ao comparar a primeira injeção e as demais, há mudança nos tempos de migração dos dois últimos sinais, em especial quando utilizado vial de menor capacidade para armazenar o BGE. Isso ocorre devido à alteração das mobilidades desses compostos, ocasionadas pela presença de eletrólise no BGE, ou seja, há mudança de pH, modificando sua capacidade tamponante. Ao manter o BGE em vial de menor capacidade, o mesmo se comportou de maneira estável durante no máximo 15 análises consecutivas (Figura 9 E), além de após a vigésima corrida demonstrar comigração dos dois últimos compostos, e nas seguintes análises causar alteração significativa entre esses sinais a ponto de inverter seus tempos de migração, PI e Tyr, (Figura 9 F). Essa característica também pode ser evidenciada através da Figura 7 B, em que as curvas de mobilidade efetiva prevêem essa inversão de sinais com alteração do pH. Já ao utilizar o vial com maior volume de BGE, o número de corridas consecutivas que se pode realizar sem alterações significativas em tempo de migração e área é aumentado para 50 (Figura 9 C).

Figura 9 - Eletroferogramas da separação dos analitos utilizando mistura de padrões de analitos e PI todos com concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . BGE em vial de vidro ( $1500 \mu\text{L}$ ): (A) Primeira injeção, (B) Após 40 injeções consecutivas e (C) Após 50 injeções consecutivas. BGE em vial de plástico ( $750 \mu\text{L}$ ): (D) Primeira injeção, (E) Após 15 injeções consecutivas e (F) Após 50 injeções consecutivas. Condições da separação: butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11, injeção  $+30\text{kV}$ ,  $50\text{mbar}$ ,  $7\text{s}$ , capilar de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno, com  $48,5 \text{ cm}$  de comprimento total,  $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo, detecção em  $210 \text{ nm}$ . Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Tabela 4 apresenta a comparação através do desvio padrão relativo da razão das áreas e dos tempos de migração, relacionando as diferentes injeções.

Tabela 4- Coeficiente de variação da razão das áreas e dos tempos de migração dos analitos, para vial com 750  $\mu\text{L}$  de capacidade entre injeção 1 e 15, e para vial com 1500  $\mu\text{L}$  de capacidade entre as injeções 1 e 40, e 1 e 50.

	CV (%) razão área corrigida AA/PI entre injeções			CV (%) tempo de migração dos AA e PI entre as injeções			
	Vial750 $\mu\text{L}$		Vial1500 $\mu\text{L}$	Vial750 $\mu\text{L}$		Vial1500 $\mu\text{L}$	
	Injeções 1 e 15	Injeções1 e 40	Injeções1 e 50	Injeções 1 e 15	Injeções 1 e 40	Injeções 1 e 50	
Trp	0,08	0,18	3,19	Trp	0,09	1,01	1,06
Phe	1,83	0,10	3,19	Phe	0,09	1,65	1,52
His	6,64	2,60	5,88	His	0,00	1,54	1,43
Met	3,16	0,54	1,61	Met	0,00	1,64	1,58
Tyr	2,40	1,96	5,69	PI	0,26	2,63	2,59
				Tyr	0,90	0,17	0,09

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2018).

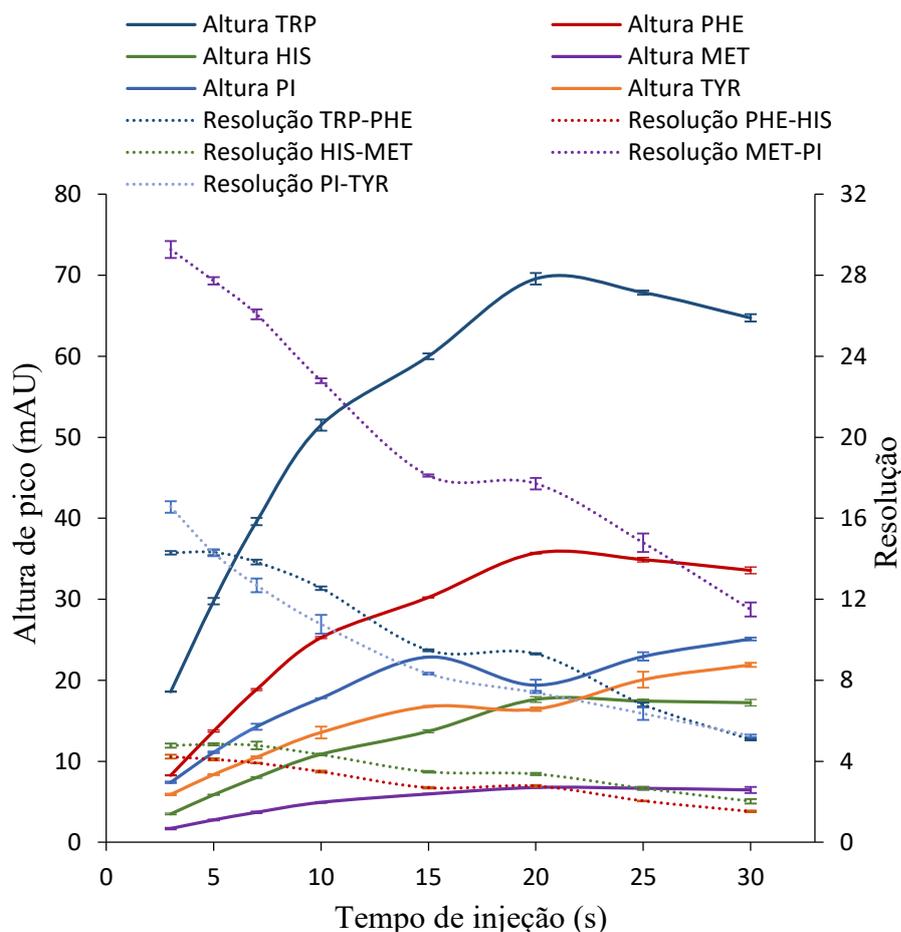
De acordo com a Tabela 4, ao avaliar o coeficiente de variação da razão das áreas, a comparação entre as injeções 1 e 40 com vial de maior volume apresentam os menores desvios. Já ao analisar os tempos de migração, o comparativo entre a injeção 1 e a 15 com vial de menor volume apresenta desvios menores. Porém, os valores mostrados pelas injeções com vial de 1500  $\mu\text{L}$  de capacidade também são satisfatórios, uma vez que o desvio é baixo tanto no comparativo das injeções 1 e 40, quanto das injeções 1 e 50.

Assim, visando manter a precisão e exatidão do método, garantir a estabilidade do BGE e a ausência de alterações significativas ao realizar diversas análises de maneira consecutiva, foi estabelecido o uso de vials de maior volume, cuja capacidade é de 1500  $\mu\text{L}$  para armazenar o BGE em contato com os eletrodos, além de realizar a troca do BGE em um intervalo de 40 injeções a fim de assegurar que as análises consecutivas não serão individualmente afetadas por alteração dos tempos e das áreas.

### 4.1.3 Seleção do tempo de injeção

Visando utilizar um volume (tempo) de injeção de forma a obter uma boa relação entre a resolução e a altura dos picos, foram realizadas injeções em triplicata da mistura de padrões de analitos e PI todos com concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando diferentes tempos de injeção: de 3 a 30 segundos. Os resultados com gráfico que relaciona tempo de injeção *versus* altura e tempo de injeção *versus* resolução para a avaliação desses parâmetros e definição do tempo ótimo a ser utilizado na injeção das análises estão na Figura 10.

Figura 10 - Gráfico relacionando altura e resolução entre os picos em função do tempo de injeção utilizando mistura de padrões de analitos e PI todos com concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições da separação: Variação dos tempos de injeção: de 3s a 30s, butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11, injeção  $+30 \text{ kV}$ ,  $50 \text{ mbar}$ , capilar de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno, com  $48,5 \text{ cm}$  de comprimento total,  $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo, detecção em  $210 \text{ nm}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ao analisar a Figura 10, nota-se que o máximo de altura de pico para todos os compostos ocorre com tempos de injeção entre 15 e 20 segundos. Porém, nesses tempos, a resolução diminui consideravelmente em relação a tempos menores de injeção, em especial ao analisar os picos de fenilalanina (Phe) e histidina (His) que para tempos de injeção entre 10s e 20s, apresentam resolução da ordem de 3,5 a 2,0, ou seja, valores muito próximos ao limite de resolução aceitável, podendo comprometer a separação desses compostos, ocasionando comigração.

Assim, priorizando a resolução suficiente entre os picos, assim como a redução do tempo total que envolve cada análise, foi escolhido 7s como tempo de injeção, pois apresenta boa resolução e altura de pico para todos os compostos.

Vale salientar que ao serem testados tempos de injeção a partir de 30 segundos ocorre alargamento de picos, ocasionando baixa resolução, o que torna impossível a separação.

## 4.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO

### 4.2.1 Conformidade do sistema

Os resultados do teste de conformidade do sistema estão apresentados na Tabela 5. Foram avaliados através do CV, a área corrigida de cada sinal (área do analito/área do padrão interno) e o tempo de migração. O número de pratos e a resolução estão dispostos com as médias das nove injeções de cada nível de concentração.

Tabela 5 - Resultados de CV para os parâmetros de área corrigida e tempo de migração, e de média para os parâmetros de número de pratos e resolução, todos obtidos com triplicata de preparo e injeção de soluções padrões em cinco níveis de concentração.

Analitos e PI	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	CV (%)		Média	
		Área corrigida	Tempo de migração	Nº de pratos*	Resolução*
Trp	5,0	3,47	0,32	950030,36	15,59
	30,0	2,90	0,31	756579,63	14,91
	40,0	1,99	0,33	634011,87	13,95
	60,0	2,44	0,25	361424,85	11,52
	100,0	2,44	0,13	315509,03	12,65
Phe	5,0	3,33	0,28	992456,32	4,86
	30,0	2,81	0,46	1019206,43	4,02
	40,0	2,01	0,38	918177,05	3,62
	60,0	1,76	0,27	626084,44	2,69
	100,0	0,68	0,15	777453,16	2,39
His	5,0	4,64	0,28	667030,19	5,14
	30,0	3,63	0,47	489713,43	4,87
	40,0	2,77	0,36	416423,45	4,79
	60,0	3,00	0,28	291704,35	4,20
	100,0	0,78	0,13	231281,94	4,36
Met	5,0	8,29	0,30	837930,42	24,02
	30,0	6,18	0,48	808548,58	28,77
	40,0	5,35	0,44	772874,24	28,94
	60,0	6,22	0,35	607353,13	28,92
	100,0	3,19	0,16	583385,86	32,58
PI	5,0		0,28	396825,52	18,43
	30,0		0,60	471739,52	10,56
	40,0		0,46	470438,31	8,69
	60,0		0,39	483073,11	5,01
	100,0		0,24	451165,40	3,60
Tyr	5,0	4,28	0,37	672742,23	
	30,0	3,35	0,62	238293,62	
	40,0	1,99	0,51	204626,23	
	60,0	2,64	0,38	160689,73	
	100,0	0,51	0,09	88421,19	

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

\*Cálculos de resolução e número de pratos realizados através da Equação 4 e Equação 5, respectivamente.

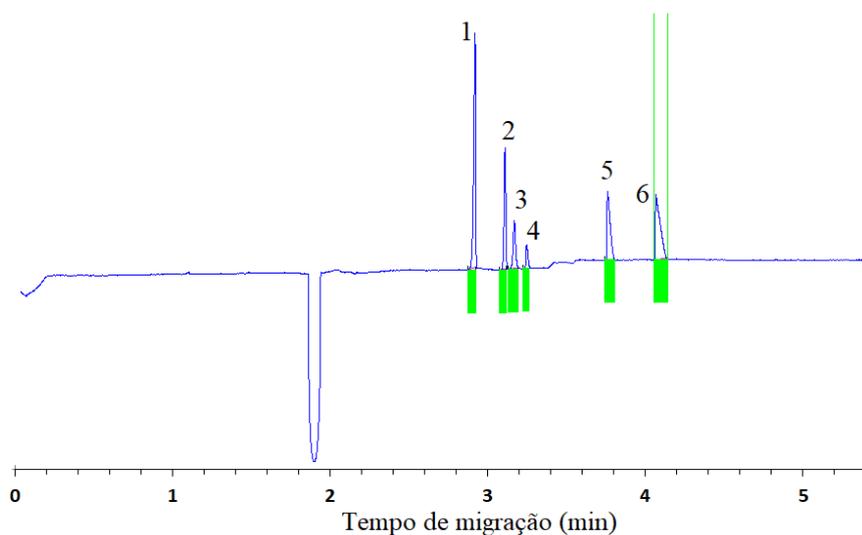
Os resultados demonstram CV para área corrigida variando de 0,68% a 8,29%. Para tempo de migração o CV está entre 0,09% e 0,62%. Esses valores estão de acordo com a especificação da (AOAC, 2016) que considera adequados valores de CV de até 11%, no caso de concentração a nível de  $\text{mg L}^{-1}$ .

A resolução entre picos (sinal de referência e sinal do interferente mais próximo) está acima de 2,0, assim como o número de pratos acima de 2.000, para todos os analitos e níveis de concentração. Tais valores estão de acordo com o definido para cromatografia, uma vez que para eletroforese capilar não há especificação descrita para estes parâmetros. Conforme os resultados é possível inferir que o sistema em estudo é adequado para ser submetido a processo de validação.

#### 4.2.2 Seletividade

A avaliação da seletividade do método realizada por meio da ferramenta do software *ChemStation*<sup>®</sup> está disposta na Figura 11.

Figura 11 - Eletroferogramas experimentais da separação utilizando a ferramenta do *software HP ChemStation*<sup>®</sup> para investigar a seletividade através da pureza de pico: (a) padrão dos cinco aminoácidos e padrão interno, todos na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições de separação: BGE  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  de butilamina e  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de MOPS, pH11, injeção 50 mbar, 7 s, 30 kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm efetivo, 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, detecção direta em 210 nm.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

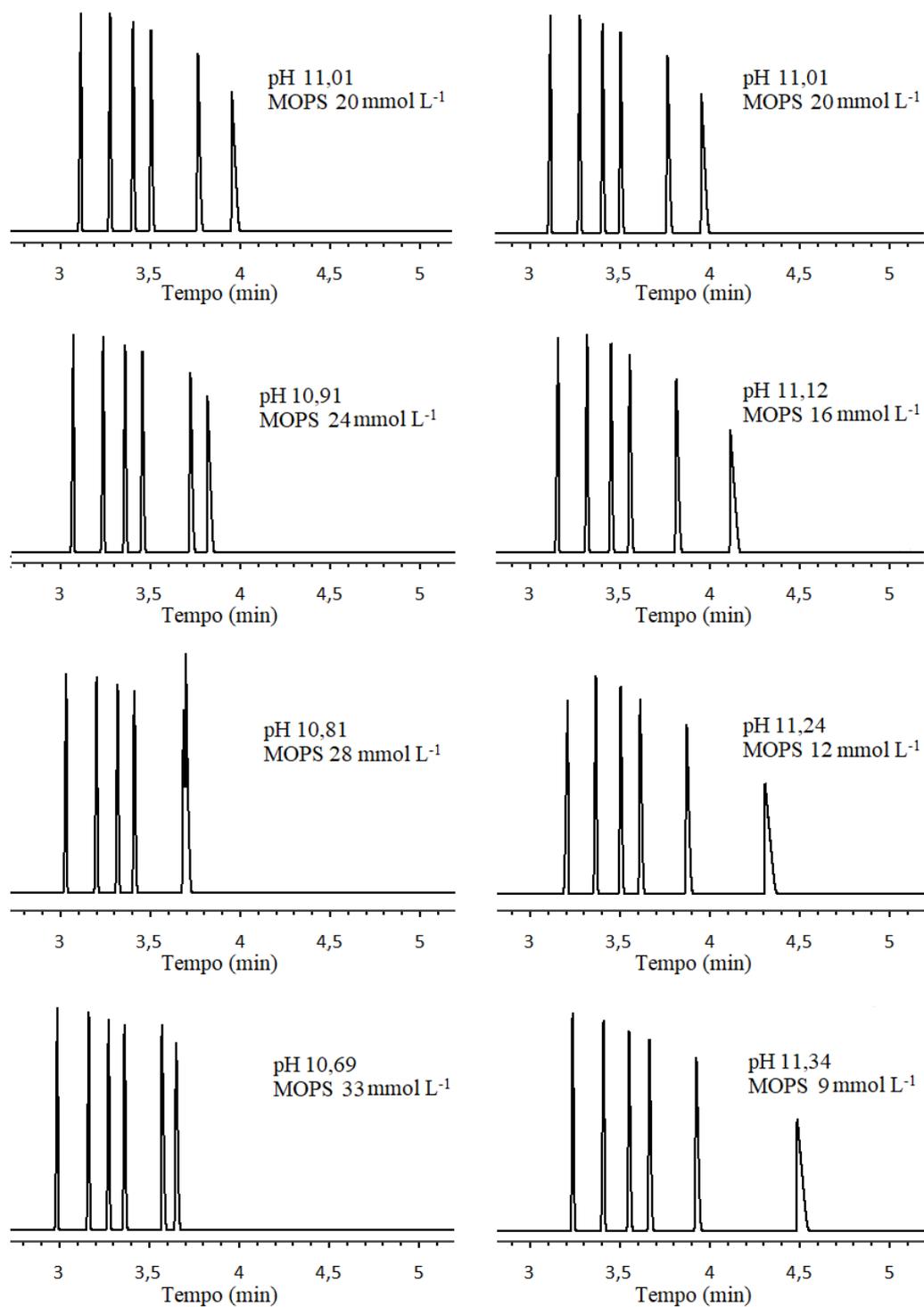
A ferramenta do software informa através de uma coloração abaixo de cada pico se há ou não sobreposição de picos. A cor verde indica que não há sobreposição de picos e a cor vermelha que há sobreposição. Conforme os eletroferogramas da Figura 11 todos os sinais estão mostrados pelo software com a cor verde, assim não há absorção simultânea de compostos na mesma região do espectro ultravioleta em todos os casos apresentados. Com isso, a seletividade do método é confirmada.

Os próprios analitos podem afetar a seletividade do método, caso não ocorra uma separação efetiva, uma vez que migram de forma independente, devido as suas mobilidades. A separação não acontece de forma efetiva através da variação de pH, ou seja, variação da composição do BGE. A fim de verificar que essas alterações interferem na seletividade, o software *PeakMaster*<sup>®</sup> foi utilizado para simular o comportamento dos sinais submetidos a pequenas variações de composição do BGE. Tais simulações são mostradas na Figura 12.

Sabendo que o pH considerado ideal para a separação é próximo a 11,0, ao avaliar a Figura 12, na coluna da esquerda que mostra variações utilizando maiores concentrações de MOPS e menores valores de pH do que o adequado. Nota-se que abaixo de pH 10,91, próximo ao pH 10,81, ocorre comigração dos últimos sinais correspondentes a PI e Tyr, respectivamente. Ainda, em pH 10,69 já pode ser observada a inversão desses dois últimos sinais, fator que prejudica a seletividade do método. Vale ressaltar que esse fato corrobora com o que foi verificado ao avaliar a estabilidade do BGE diante de análises consecutivas. Portanto, ao considerar a coluna à direita na mesma Figura 12, que apresenta as simulações com menores concentração de MOPS, por consequência pHs maiores, é possível notar que com o aumento de pH ocorre apenas o aumento no tempo de migração de todos os analitos, sendo evidenciado em maior magnitude no último que representa Tyr (menor mobilidade), porém nesse caso não há comigração nem inversão de tempo nos sinais.

Assim, foram consideradas aceitas variações de pH na ordem de 0,1 unidade abaixo de pH 11,0 e até 0,3 unidades acima desse pH.

Figura 12 - Eletroferogramas simulados no software *PeakMaster*<sup>®</sup> com concentração fixa de butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup>, variando a concentração MOPS entre 9 a 33mmol L<sup>-1</sup>. Condições da simulação para separação: injeção +30 kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo, detecção direta com correção da força iônica.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

### 4.2.3 Linearidade – Faixa de trabalho

As curvas de calibração externa consistiram em nove níveis de concentração, a partir do preparo de soluções padrões dos analitos e padrão interno na concentração constante de  $30\text{mg L}^{-1}$  em todas as análises. O preparo e a injeção de cada nível foram realizados em triplicata, gerando nove dados de cada um dos nove níveis de concentração. Com esses dados, foram gerados gráficos de regressão linear para cada um dos compostos, com correção da área com padrão interno, cujos resultados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de linearidade, desvio padrão inclinação e intercepto da curva de calibração com nove níveis de concentração preparados e injetados em triplicata, com correção de área de todos os analitos com padrão interno.

Parâmetros	Analitos				
	Trp	Phe	His	Met	Tyr
Linearidade - faixa de calibração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	5,0 - 100,0				
Linearidade-inclinação ( $\text{L mg}^{-1}$ )	0,0629	0,0301	0,0173	0,0063	0,0412
Desvio padrão inclinação	0,0005	0,0003	0,0001	0,0002	0,0001
Linearidade-intercepto	0,1292	0,0532	0,0105	0,0264	0,1236
Desvio padrão intercepto	0,0265	0,0073	0,0070	0,0050	0,0227
Linearidade-coeficiente determinação ( $R^2$ )	0,9984	0,9990	0,9980	0,9933	0,9975

\*n = 9.

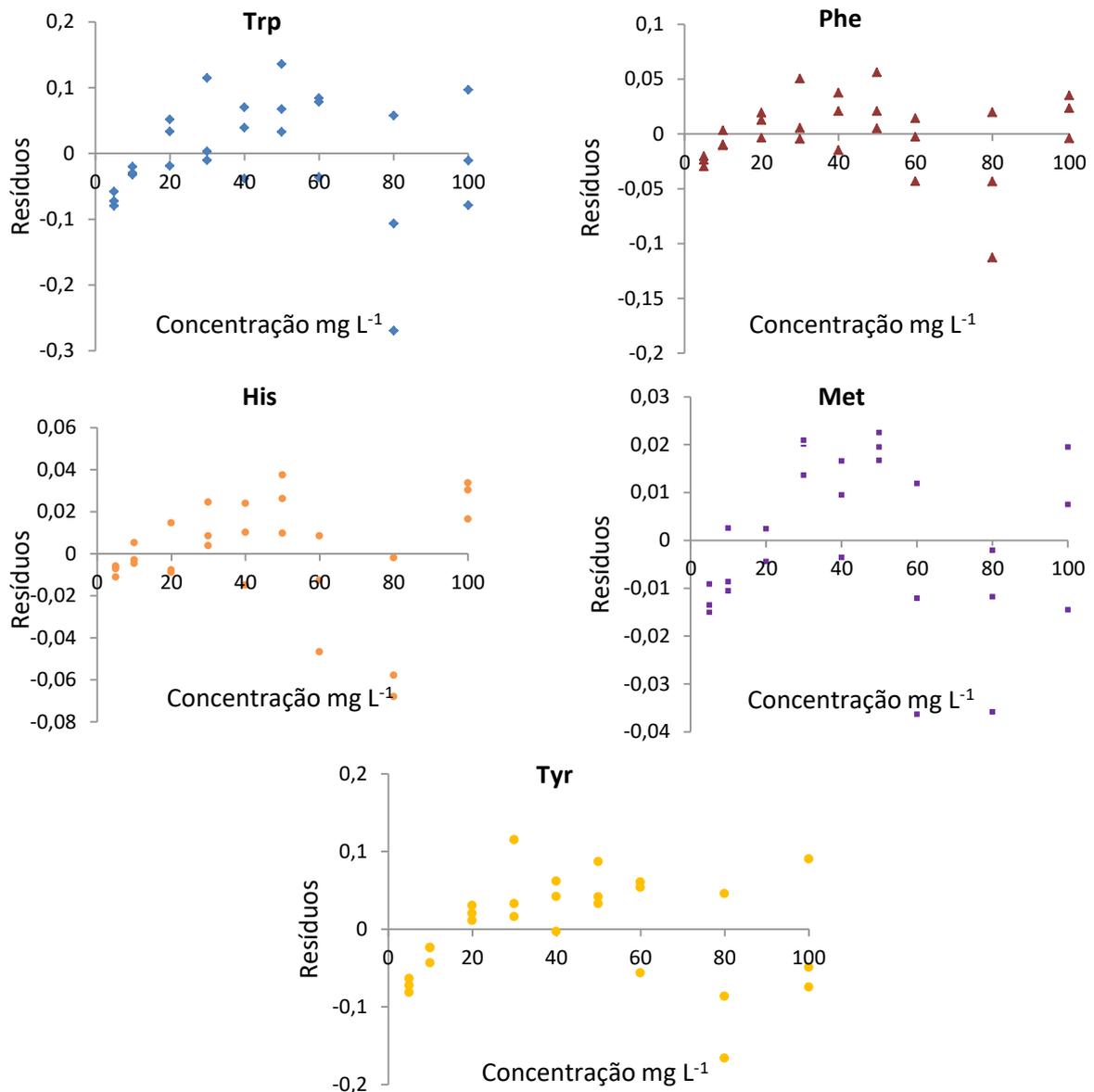
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Conforme os dados da Tabela 6, foram encontrados coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,99 e valores baixos de desvio padrão tanto para inclinação como para intercepto. Esses resultados estão de acordo com o recomendado pelo ICH e ANVISA.

Para verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*), a partir dessas curvas de calibração, foram plotados gráficos de resíduos, mostrados Figura 13, além da confirmação através do teste de Grubbs.

Através dos gráficos de resíduos pode-se verificar um padrão aleatório, indicando que satisfaz as pressuposições de mínimos quadrados comuns. Além disso, o teste de Grubbs confirmou que não há presença de *outliers*.

Figura 13. Gráficos de resíduos da regressão linear das curvas externas dos analitos: Trp, Phe, His, Met e Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor .

#### 4.2.4 Exatidão

A partir da média dos resultados de cada um dos cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata para amostras de solução parenteral, alcançados através de ensaio de adição recuperação, foram obtidas as recuperações mostradas na Tabela 7. Os resultados para amostras de medicamentos estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 7. Resultados de recuperação para os analitos Trp, Phe, His, Met, e Tyr em amostras de solução parenteral.

Concentração padrão adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)				
	Trp	Phe	His	Met	Tyr
5,0	95,52	109,98	88,06	84,69	80,94
10,0	108,48	109,86	80,66	97,62	82,50
20,0	103,49	108,59	82,01	91,99	90,50
40,0	107,48	109,96	84,70	93,92	105,36
50,0	109,03	107,56	85,53	95,22	109,02

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 8. Resultados de recuperação para Metem amostra de Hepatoprotetor

Concentração padrão adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
	Met
5,0	82,72
10,0	91,09
20,0	103,22
40,0	97,24
50,0	107,42

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os resultados da Tabela 7 e Tabela 8 mostram que os ensaios de recuperação estão na faixa recomendada de 80 a 110%. Cabe se ressaltar que o desvio padrão observado em todos os casos foi menor que 10%.

#### 4.2.5 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada através de repetibilidade (injeções no mesmo dia), precisão intermediária (injeções em diferentes dias) e reprodutibilidade (utilizando diferentes laboratórios / equipamentos), cujos resultados estão mostrados nas Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente. Foram preparadas e injetadas em triplicata as soluções padrão em cinco níveis de concentração.

Tabela 9. Valores de repetibilidade, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata.

Analitos	Conc. mg L <sup>-1</sup>	Repetibilidade			
		Média		(CV%)	
		Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida	Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida
Trp	5,0	2,90	0,37	0,32	3,47
	30,0	2,92	2,05	0,31	2,9
	40,0	2,93	2,68	0,33	1,99
	60,0	2,94	3,92	0,25	2,44
	100,0	2,93	6,47	0,65	2,88
Phe	5,0	3,09	0,18	0,28	3,33
	30,0	3,12	0,97	0,46	2,81
	40,0	3,12	1,27	0,38	2,01
	60,0	3,14	1,85	0,27	1,76
	100,0	3,16	3,08	0,34	3,64
His	5,0	3,16	0,09	0,28	4,64
	30,0	3,18	0,54	0,47	3,63
	40,0	3,18	0,71	0,36	2,77
	60,0	3,20	1,03	0,28	3,00
	100,0	3,20	1,77	0,44	3,36
Met	5,0	3,23	0,04	0,3	8,29
	30,0	3,26	0,23	0,48	6,18
	40,0	3,27	0,28	0,44	5,35
	60,0	3,28	0,39	0,35	6,22
	100,0	3,29	0,65	0,44	6,61
Tyr	5,0	4,15	0,26	0,46	4,28
	30,0	4,08	1,41	0,78	3,35
	40,0	4,06	1,8	0,54	1,99
	60,0	4,00	2,61	0,23	2,64
	100,0	3,93	4,23	0,74	5,13

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 10. Valores de precisão intermediária, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata.

Analitos	Conc. mg L <sup>-1</sup>	Precisão Intermediária			
		Média		(CV%)	
		Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida	Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida
Trp	5,0	2,99	0,35	0,18	2,10
	30,0	3,00	2,08	0,24	1,72
	40,0	2,98	2,66	0,12	2,06
	60,0	2,99	3,79	0,55	3,26
	100,0	3,33	6,20	0,13	1,53
Phe	5,0	3,19	0,17	0,18	2,15
	30,0	3,20	0,97	0,25	1,40
	40,0	3,19	1,30	0,12	1,74
	60,0	3,20	1,81	0,54	4,21
	100,0	3,59	3,01	0,15	0,98
His	5,0	3,27	0,08	0,19	4,16
	30,0	3,27	0,54	0,28	2,52
	40,0	3,25	0,71	0,13	4,04
	60,0	3,26	1,02	0,64	6,64
	100,0	3,64	1,74	0,13	2,29
Met	5,0	3,35	0,04	0,18	4,04
	30,0	3,35	0,23	0,28	3,42
	40,0	3,34	0,29	0,11	5,06
	60,0	3,35	0,40	0,61	8,90
	100,0	3,75	0,65	0,16	3,65
Tyr	5,0	4,29	0,25	0,21	4,06
	30,0	4,19	1,38	0,46	2,45
	40,0	4,13	1,82	0,36	1,45
	60,0	4,08	2,50	0,92	3,86
	100,0	4,67	4,32	0,09	0,99

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 11. Valores de reprodutibilidade, na avaliação da precisão do método, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata.

Analitos	Conc. mg L <sup>-1</sup>	Reprodutibilidade			
		Média		(CV%)	
		Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida	Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida
Trp	5,0	2,96	0,35	0,08	0,98
	30,0	2,97	2,05	0,09	2,46
	40,0	2,97	2,65	0,05	0,73
	60,0	2,97	3,75	0,04	4,43
	100,0	2,98	6,12	0,08	2,6
Phe	5,0	3,16	0,17	0,01	1,12
	30,0	3,17	0,99	0,08	1,19
	40,0	3,17	1,31	0,06	0,93
	60,0	3,17	1,85	0,06	4,31
	100,0	3,19	3,01	0,16	2,23
His	5,0	3,24	0,07	0,11	4
	30,0	3,24	0,55	0,07	2,03
	40,0	3,23	0,75	0,04	0,82
	60,0	3,23	1,05	0,04	4,45
	100,0	3,24	1,72	0,11	2,02
Met	5,0	3,32	0,04	0,11	9,11
	30,0	3,32	0,22	0,07	3,12
	40,0	3,31	0,29	0,04	1,83
	60,0	3,32	0,4	0,04	3,42
	100,0	3,32	0,65	0,12	2,36
Tyr	5,0	4,25	0,22	0,09	4,42
	30,0	4,15	1,42	0,26	1,59
	40,0	4,11	1,87	0,21	1,05
	60,0	4,05	2,61	0,24	4,43
	100,0	3,98	4,32	0,19	1,85

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os resultados distribuídos na Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11 demonstram que os valores de média de área corrigida e média de tempo de migração se mantêm próximos ao comparar as precisões: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O desvio padrão em todos os casos está abaixo de 10%, ou seja, de acordo com o recomendado pela AOAC para níveis de concentração da ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ . Assim, pode-se afirmar que o método proposto é preciso na faixa estudada.

#### **4.2.6 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)**

Os valores obtidos para os limites de detecção utilizando os parâmetros da curva de calibração estão entre  $8,8 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,63 \text{ mg L}^{-1}$ . Ao utilizar a razão sinal/ruído para mensurar esse parâmetro, os resultados se mostraram na faixa de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ .

Na avaliação dos limites de quantificação, foram encontrados valores de  $2,43 \text{ mg L}^{-1}$  a  $7,96 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando os parâmetros da curva de calibração. Já através da razão sinal/ruído, a faixa encontrada foi de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ .

Sendo assim, os valores obtidos para LD e LQ são maiores ao utilizar os parâmetros da curva de calibração em comparação aos valores encontrados através da relação sinal/ruído. Devido à sensibilidade da técnica optou-se por utilizar os limites obtidos através da razão sinal/ruído.

#### **4.2.7 Robustez**

A Tabela 12 apresenta os resultados de CV% dos tempos de migração e área de pico corrigida, ao comparar os dezoito eletroferogramas obtidos para cada um dos cinco níveis de concentração, sendo nove desses em condição ideal de BGE com pH 11,00 e os demais com proposital variação com pH de 11,25, além de diferentes colunas capilares do mesmo fabricante, afim de verificar se a variação usando as diferenças citadas seria significativa.

As respostas da Tabela 12 mostram valores de CV abaixo de 11%, confirmando a robustez do método, uma vez que se as variações das respostas estiverem dentro dos limites considerados nos parâmetros de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, o método pode

ser considerado robusto de acordo com as alterações empregadas, as quais poderiam ocorrer na execução dos experimentos (RIBANI et al., 2004).

Tabela 12. Valores de CV (%) para tempo de migração e área do pico corrigida, para avaliação da robustez, utilizando cinco níveis de concentração preparados e injetados em triplicata, em diferentes condições de pH: 11,00 e 11,25 com diferentes colunas capilares do mesmo fabricante.

Analito	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	CV%	
		Tempo de migração (min)	Área do pico corrigida
Trp	5,0	3,22	5,72
	30,0	5,00	2,43
	40,0	5,28	2,52
	60,0	5,82	2,70
	100,0	6,51	2,81
Phe	5,0	3,39	3,08
	30,0	5,29	2,59
	40,0	5,59	2,48
	60,0	6,11	1,76
	100,0	6,53	2,86
His	5,0	3,54	8,66
	30,0	5,38	3,39
	40,0	5,67	3,23
	60,0	6,20	2,53
	100,0	6,58	2,92
Met	5,0	3,51	6,25
	30,0	5,48	5,71
	40,0	5,74	4,70
	60,0	6,31	4,72
	100,0	6,68	5,22
Tyr	5,0	4,14	3,68
	30,0	6,85	3,13
	40,0	7,23	2,08
	60,0	8,13	2,21
	100,0	8,86	3,72

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A partir desses resultados, também é possível confirmar os eletroferogramas simulados dispostos na Figura 12, que mostram que com a variação de pH utilizada, além de não afetar a seletividade, não há alteração significativa das áreas corrigidas e dos tempos de migração para a separação dos analitos e PI.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NAS AMOSTRAS

##### 4.3.1 Soluções Parenterais

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos para as duas amostras de solução parenterais analisadas e a comparação com a concentração de cada analito declarada no rótulo do produto, assim como o teste *t-Student*.

Tabela 13. Comparação entre os dados de concentração presentes no rótulo do produto e o resultado encontrado ao realizar a análise para as amostras A e B.

Amostra	Conc. Rótulo (g L <sup>-1</sup> ) *	Conc. encontrada (g L <sup>-1</sup> ) *	t calculado	Resultado da hipótese**	Diferença significativa	
A	Trp	2,01	2,03 ± 0,08	0,69	t <sub>cal</sub> <t <sub>tab</sub>	Não
	Phe	3,75	4,24 ± 0,19	7,59	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim
	His	4,76	7,05 ± 0,31	22,21	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim
	Met	3,12	3,34 ± 0,24	2,78	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim
	Tyr	4,20	6,86 ± 1,65	4,82	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim
B	Trp	2,01	1,88 ± 0,45	0,85	t <sub>cal</sub> <t <sub>tab</sub>	Não
	Phe	3,75	3,78 ± 0,87	0,09	t <sub>cal</sub> <t <sub>tab</sub>	Não
	His	4,76	6,38 ± 1,35	3,58	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim
	Met	3,12	3,06 ± 0,85	0,20	t <sub>cal</sub> <t <sub>tab</sub>	Não
	Tyr	4,20	5,97 ± 1,33	3,95	t <sub>cal</sub> >t <sub>tab</sub>	Sim

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

\*A quantidade é declarada no rótulo com concentração da ordem de g L<sup>-1</sup>, foi realizada a conversão para mg L<sup>-1</sup>, e fator de diluição de 100 vezes nas amostras, para que as concentrações estivessem no intervalo da curva de calibração.

\*\*n = 9, grau de confiança 95%, t<sub>tab</sub>=2,31

Ao aplicar o teste *t-Student*, para avaliar se é significativa a diferença entre o valor médio encontrado e o verdadeiro (rótulo), é considerado que se o valor de *t* calculado ( $t_{cal}$ ) for maior que o valor de *t* tabelado ( $t_{cal}$ ), a hipótese nula é rejeitada, ou seja o método fornece resultados que são significativamente diferentes do valor verdadeiro.

Conforme visualizado na Tabela 13, para amostra A, de acordo com o teste *t-Student*, dos cinco aminoácidos estudados, o triptofano foi o único analito que não apresentou diferença significativa entre o valor declarado pelo fabricante no rótulo e o valor encontrado experimentalmente. Já ao avaliar a amostra B, utilizando o mesmo teste, a diferença não é significativa para os analitos triptofano, fenilalanina e metionina. Nesse caso, o método pode ser usado com 95% de confiança para até três dos cinco analitos. Os analitos histidina e tirosina foram os que apresentaram as maiores diferenças em ambas amostras.

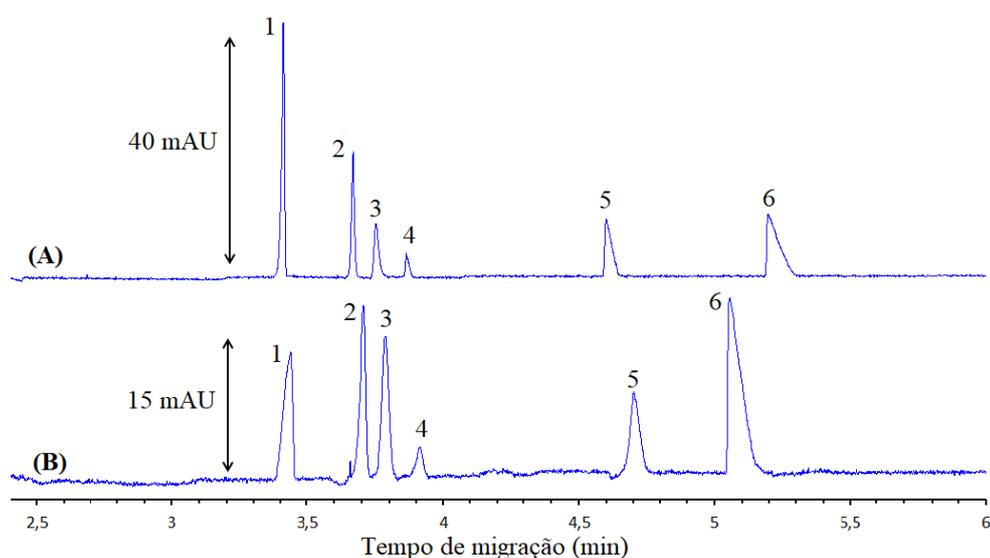
Entre as possíveis causas dessas diferenças, pode-se citar o alto fator de diluição a que as amostras foram submetidas, o fato de que as amostras se encontravam no último mês de seu prazo de validade que no total são 24 meses, e de estarem a aproximadamente 20 dias abertas antes da análise, permanecendo esse tempo armazenada em geladeira, o que pode ter causado degradação que interfira nos resultados. Além disso, a tirosina é declarada no rótulo como acetiltirosina  $5,176 \text{ g L}^{-1}$  (= tirosina  $4,20 \text{ g L}^{-1}$ ), fator que pode interferir na quantificação.

As amostras de solução parenteral de uso intravenoso, na forma de solução para infusão de uso pediátrico, contendo uma mistura de aminoácidos, conforme indicações do rótulo, são mantidas em temperatura ambiente não superior a  $25^{\circ}\text{C}$ , ao abrigo da luz, até que seja necessário o seu uso. Após abertas, do ponto de vista microbiológico, deve ser utilizado imediatamente, caso contrário, divergências são responsabilidade do usuário. Normalmente, a mistura não deve ser armazenada por mais de 24 horas entre  $2$  e  $8^{\circ}\text{C}$  e não devem ser utilizadas se houver turvação ou depósito, além de não dever ser congelada.

As duas amostras analisadas nesse trabalho foram doadas após permanecer por um período médio de 10 dias em geladeira após abertas. Ao receber a doação, foram armazenadas por mais cerca de 10 dias e então retiradas da refrigeração até atingir temperatura ambiente, diluídas com água utilizando fator de diluição de 100 vezes e analisadas por eletroforese capilar nas condições já especificadas e validadas. O preparo e a injeção foram realizados em triplicata. Foram analisadas duas amostras de diferentes lotes. Uma terceira amostra foi doada,

porém como já apresentava turbidez e depósito de algumas partículas, não foi submetida à análise. A Figura 14 apresenta um comparativo entre os eletroferogramas da amostra de solução parenteral e de uma mistura de padrões de AA.

Figura 14. Eletroferogramas comparativos de: (A) mistura de padrões de AA e PI todos na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , (B) amostra de solução parenteral diluída 100 vezes em água adicionada de padrão interno na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições experimentais: BGE: butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11,01, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com a Figura 14, é possível observar a similaridade entre o eletroferograma de uma mistura de padrões dos AA e PI na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e a amostra de solução parenteral analisada diluída 100 vezes, inferindo que o método proposto está em concordância quanto ao perfil esperado para o eletroferograma e quanto ao tempo de migração de cada analito.

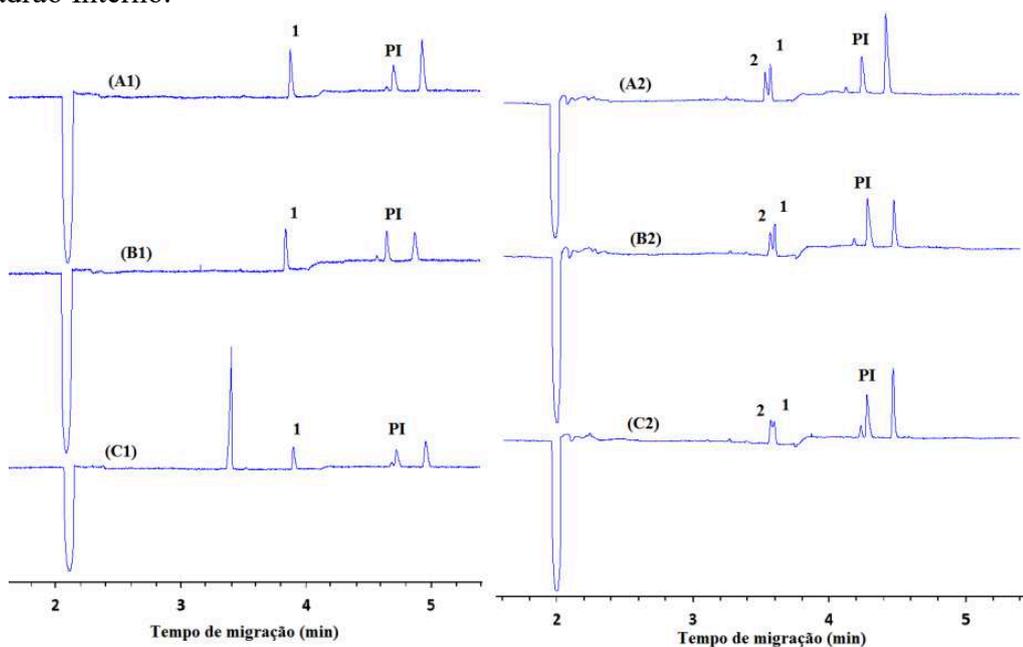
Assim, pode-se concluir que o método proposto pode ser aplicado para análise de solução parenteral dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e metionina, mas ainda necessitam alguns ajustes, visto que para uma das amostras houveram diferenças significativas. Porém, para os analitos histidina e tirosina as diferenças foram significativas em ambas amostras.

Assim, para se ter resultados mais fiéis a realidade com que as soluções parenterais são utilizadas, o ideal seria analisar as amostras assim que essas fossem abertas, a fim de evitar qualquer degradação ou alteração que possa estar sendo causada devido ao tempo de armazenamento após frasco aberto, não recomendado pelo fabricante. Além disso, seria interessante analisar amostras em que o prazo de validade não esteja tão próximo do final.

#### 4.3.2 Medicamentos

Entre os medicamentos hepatoprotetores que contém metionina, foram testadas três diferentes marcas, analisadas em triplicata de preparo e de injeção. Todas declaram no rótulo a concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de metionina, porém possuem diferentes excipientes, tais como sorbitol, sacarina, parabenos, etc. Inicialmente foram testadas usando diferentes fatores de diluição: 100 e 200 vezes. Os eletroferogramas são mostrados na Figura 15.

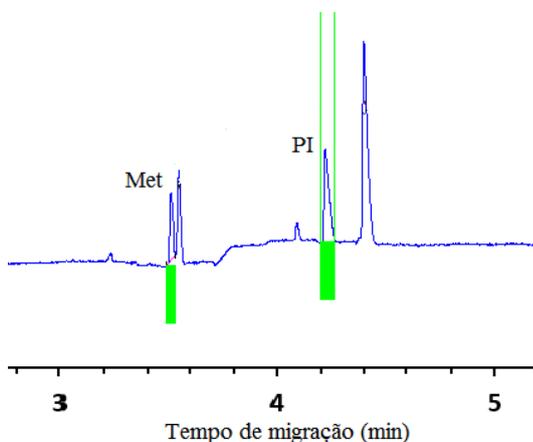
Figura 15. Eletroferogramas comparando o perfil de separação utilizando diferentes diluições nas 3 amostras de medicamento de diferentes marcas. (A1) amostra A diluída 200 vezes, (A2) amostra A diluída 100 vezes, (B1) amostra B diluída 200 vezes, (B2) amostra B diluída 100 vezes, (C1) amostra C diluída 200 vezes, (C2) amostra C diluída 100 vezes. Condições experimentais: BGE: butilamina  $70 \text{ mmol L}^{-1}$  e MOPS  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 11,01, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1-sinal desconhecido, 2- Metionina, PI – Padrão Interno.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Conforme pode ser visualizado na Figura 15, para os dois fatores de diluição utilizados, o perfil de separação se mostrou diferente quanto ao sinal referente ao analito metionina. Ao utilizar o fator de diluição de 200 vezes, (Figura 15 A1, B1 e C1) nota-se um único sinal no tempo correspondente a metionina, porém ao avaliar a seletividade, há presença de um espectro interferente, o que não permite quantificar adequadamente o sinal. Utilizando o fator de diluição de 100 vezes houve a melhor separação desses sinais na amostra A (Figura 15A2), porém nas amostras B e C (Figura 15 B2 e C2) é possível perceber a sobreposição de sinal, mas não separá-los. Mesmo com essa melhor separação de picos na amostra A, nota-se que estes ainda estão bem próximos. Por isso, foi verificada a seletividade ao quantificar cada sinal, que está representada na Figura 16.

Figura 16. Seletividade avaliada através da ferramenta do *software PeakMaster®* para verificar a pureza de pico referente à metionina da amostra A diluída 100 vezes. Condições experimentais: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,01, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: Met- Metionina, PI – Padrão Interno.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 16 mostra que o sinal se apresenta seletivo para metionina. Assim, foi realizada a quantificação da amostra A diluída 100 vezes e comparado ao valor declarado no rótulo pelo fabricante. Esses dados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados encontrados para metionina na amostra A de medicamento e teste *t-Student*.

Amostra/ Analito	Conc. Rótulo (g mL <sup>-1</sup> )*	Conc. encontrada (g mL <sup>-1</sup> )*	<i>t</i> calculado	Resultado da hipótese**	Diferença significativa
A Met	10,0	9,45 ± 0,20	8,02	$t_{cal} > t_{tab}$	Sim

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

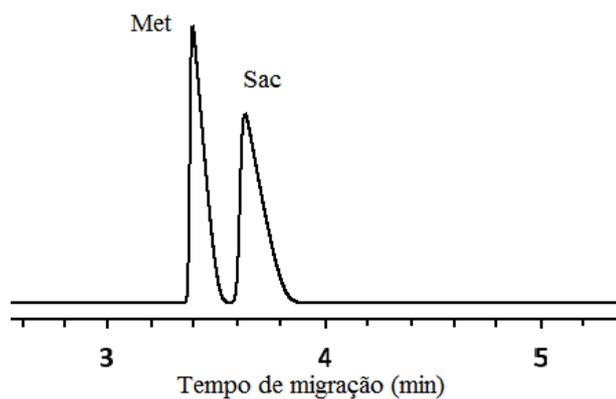
\*A quantidade é declarada no rótulo com concentração da ordem de g mL<sup>-1</sup>, foi realizada a conversão para mg L<sup>-1</sup>, e fator de diluição de 100 vezes nas amostras, para que as concentrações estivessem no intervalo da curva de calibração.

\*\*n = 9, grau de confiança 95%,  $t_{tab} = 2,31$

Os resultados da Tabela 14 mostram valor similar ao declarado no rótulo, para a amostra A, porém o teste *t-Student* mostrou diferença significativa entre esses valores.

Para avaliar os outros componentes da formulação possíveis interferentes nesse sinal, foi utilizado o *software PeakMaster*<sup>®</sup> para simular o perfil na presença desses compostos. O resultado da simulação está disposto na Figura 17

Figura 17. Eletroferograma simulado no *software PeakMaster*<sup>®</sup> para visualizar sacarina e metionina. Condições da simulação para separação: BGE butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>. Injeção +30kV, capilar com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção direta com correção da força iônica. Legenda: Met- Metionina, Sac- Sacarina.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O eletroferograma simulado, apresentado na Figura 17 sugere que realmente o interferente pode ser a sacarina. Para a confirmação, seria necessária a análise utilizando padrão de sacarina.

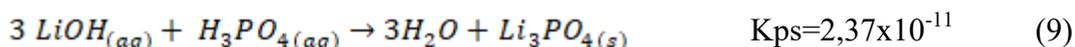
A fim de obter dados mais conclusivos, seria necessário aplicar o método em maior número de amostras, visto que das três amostras disponíveis, apenas uma foi avaliada, já que nas demais houve sobreposição de sinais, como já abordado.

### 4.3.3 Banana

É conhecido que a força iônica pode prejudicar as separações por CE devido à corrente elétrica gerada em soluções com alta concentração de íons, seja no BGE ou na solução da amostra. No caso de análises de aminoácidos em alimentos a recomendação é realizar hidrólise para converter as proteínas em aminoácidos correspondentes. Por isso, visando ajustar a força iônica do meio reacional, um procedimento de preparo de amostras após as hidrólises básica e ácida em amostra banana foi investigado neste estudo.

#### 4.3.3.1 Hidrólise básica

Na hidrólise básica foi usada como base o hidróxido de lítio (LiOH), e para ajuste de pH e força iônica do meio reacional o ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Esse aditivo permite neutralizar o OH<sup>-</sup> proveniente da base e precipitar o Li<sup>+</sup>, conforme descrito na Equação 9 dessa forma ajustando o pH e a concentração de íons na solução a ser injetada no CE.



Com o objetivo de avaliar o efeito desse aditivo, foi realizado experimento adicionando volumes conhecidos de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado no meio reacional contendo LiOH 4,0 mol L<sup>-1</sup>. Medidas indiretas de força iônica foram realizadas por CE enchendo o capilar e aplicando diferença de potencial, anotando o valor de corrente correspondente. Também a cada volume adicionado foi medido o pH. Os dados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 15 e na Figura 18.

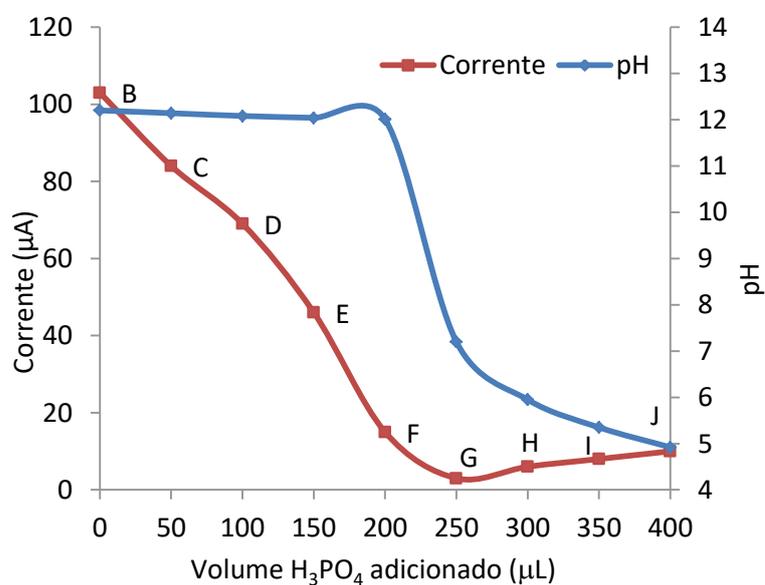
Conforme os resultados da Tabela 15 e da Figura 18, pode-se visualizar que a cada adição de ácido há diminuição de pH e corrente até o ponto em que o pH continua reduzindo, porém a corrente começa a aumentar novamente (ponto H). Com isso, tem-se que a provável condição ideal está a partir do ponto E, uma vez que a partir desse ponto a corrente se mostra menor, o que ocasiona menor força iônica e auxilia o perfil da separação.

Tabela 15. Valores da variação de pH e corrente observadas para cada volume de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  P.A. adicionado a 5 mL de uma solução de  $\text{LiOH}$   $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ , para cada um dos pontos estudados.

Ponto	Volume adicionado de $\text{H}_3\text{PO}_4$ P.A. ( $\mu\text{L}$ )	pH	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
B	0	12,20	103
C	50	12,14	84
D	100	12,08	69
E	150	12,04	46
F	200	12,01	15
G	250	7,20	3
H	300	5,95	6
I	350	5,35	8
J	400	4,92	10

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 18. Variação de pH e corrente observadas para cada volume de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  adicionado a 5,0 mL de solução de  $\text{LiOH}$   $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

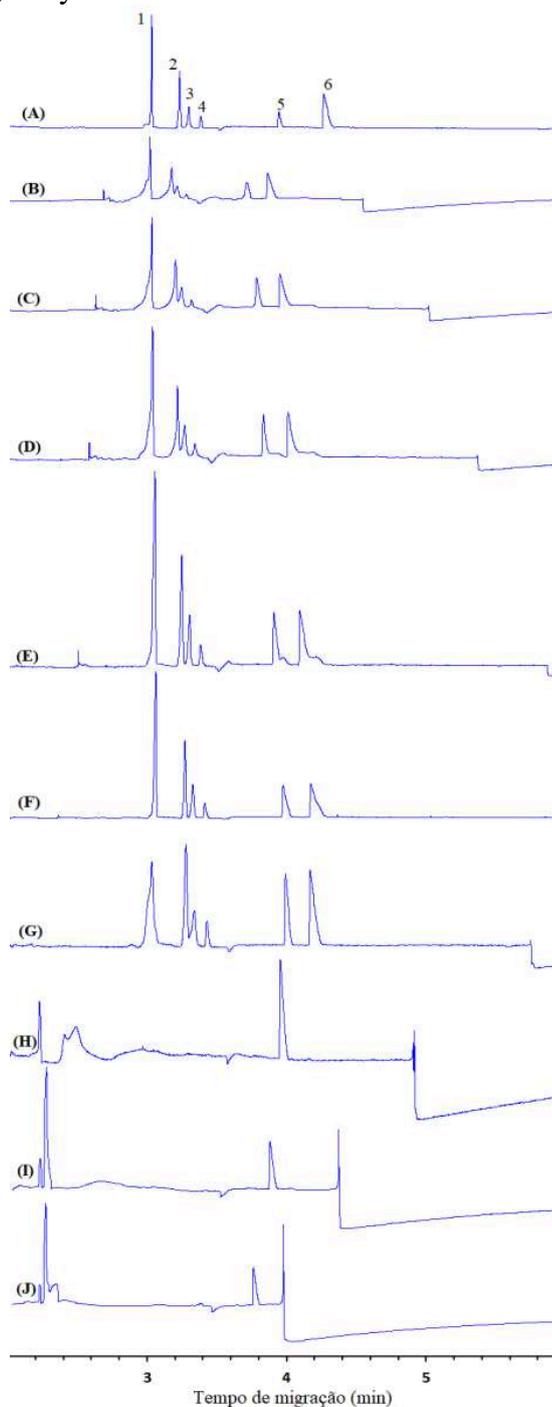
Em seguida, a cada um dos pontos avaliados, foi adicionada solução padrão dos analitos para comparar o comportamento do perfil de separação nas diferentes condições de

força iônica, assim como para definir o ponto ótimo de adição de ácido na neutralização/precipitação a ser utilizado nas amostras. Os eletroferogramas com esses resultados em comparação a análise de uma solução padrão, estão apresentados na Figura 19.

A partir dos eletroferogramas mostrados na Figura 19, pode-se notar que o melhor perfil de separação, mais próximo ao perfil de uma solução padrão (ponto A), em que é possível a separação adequada dos analitos e padrão interno está no eletroferograma F, no qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 5,0 mL de solução  $\text{LiOH}$  4,0 mols  $\text{L}^{-1}$ , com pH 12,01 e corrente de 15  $\mu\text{A}$ . Nos eletroferogramas anteriores a esse ponto, a linha de base se mostra com muito ruído e não há boa resolução entre alguns analitos. Nos eletroferogramas após o ponto F, os analitos praticamente não são identificados e também há muito ruído na linha de base, fatores que impossibilitam a análise. Tais resultados auxiliaram a conhecer a quantidade aproximada de ácido que deveria ser usada na neutralização/precipitação após realizar o procedimento de hidrólise.

O próximo passo consistiu em realizar a hidrólise em distintas situações: uma solução de padrões, duplicata da amostra de banana e amostra de banana fortificada com padrões. Então, após hidrólise foi medido o pH após centrifugação a cada volume de ácido adicionado, até se obter um ponto abaixo de pH 12, cujos resultados estão mostrados na Tabela 16.

Figura 19. Comparação do perfil de separação para cada uma das condições avaliadas na solução utilizada em hidrólise básica e padrão: (A) solução padrão 30 mg L<sup>-1</sup>, (B) ponto B, (C) ponto C, (D) ponto D, (E) ponto E, (F) ponto F, (G) ponto G, (H) ponto H, (I) ponto I e (J) ponto J. Condições de separação: BGE:butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 10,98, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 16. Valores da variação de pH observada para cada volume de  $H_3PO_4$  adicionado a 5 mL do extrato obtido após a hidrólise básica.

Volume total de $H_3PO_4$ adicionado ( $\mu L$ )	Hidrólise básica - pH			
	Padrão	Banana + padrão	Banana 1	Banana 2
Zero	12,77	12,48	12,86	12,42
50	12,62	12,3	12,76	12,33
100	12,27	12,29	12,4	12,3
150	9,94	9,89	6,37	6,82

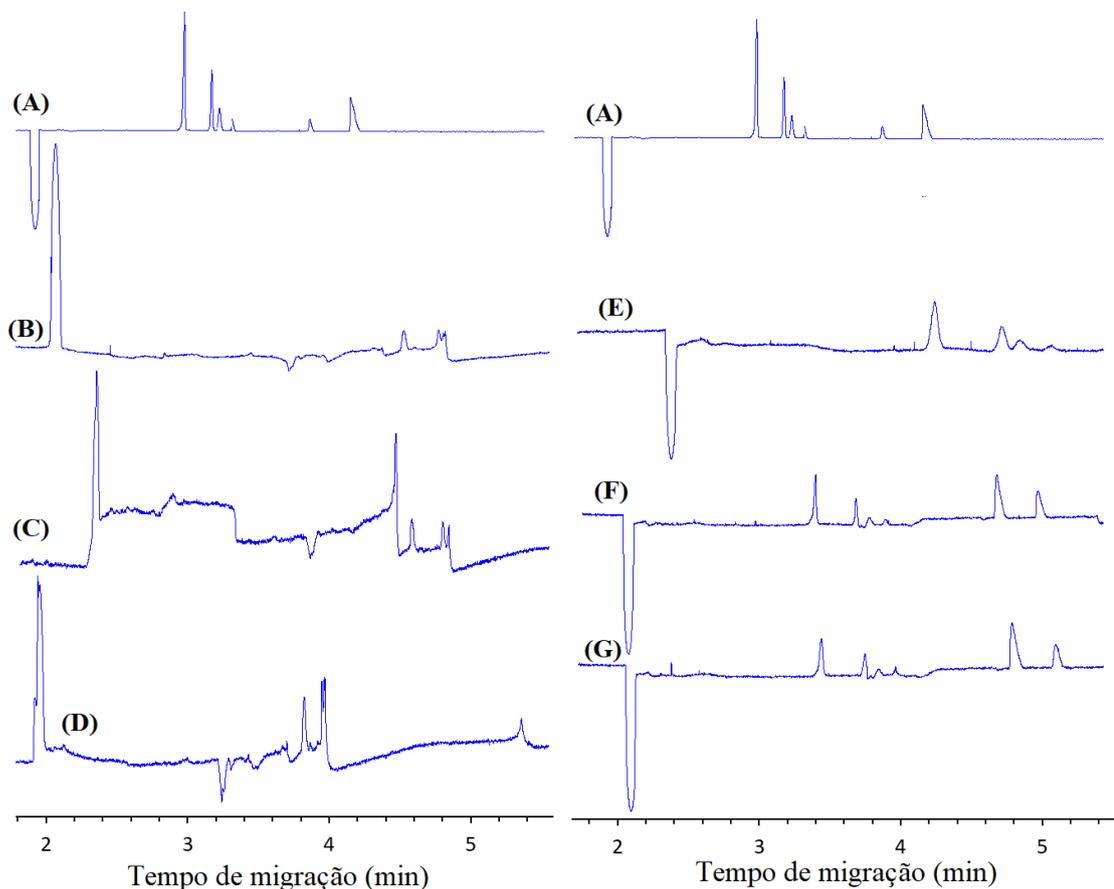
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como se pode notar com a Tabela 16, em todos os casos, a adição de 100  $\mu L$  de  $H_3PO_4$  foi suficiente para obter o último ponto antes da maior queda de pH. Em seguida, os extratos foram diluídos 5 vezes e 20 vezes, foi adicionado padrão interno e submetido à análise. Como os resultados apresentaram muito ruído e tiveram perfis bem similares, o extrato final da banana foi diluído com padrões a fim de comparar a interferência da força iônica nas diferentes situações. Os eletroferogramas da banana e da banana fortificada com padrões estão mostrados na Figura 20.

Pelos resultados, infelizmente se pode prever que a hidrólise interferiu fortemente no perfil dos eletroferogramas, não permitindo a quantificação dos analitos. O que se pode notar comparando os eletroferogramas (B) e (C) é que houve uma considerável redução de fluxo correspondente ao sinal próximo a 2 minutos, significando também a menor interferência da força iônica. Ao comparar os eletroferogramas (E) e (F) é notável uma melhoria com relação ao perfil, sendo o (F), em que foi utilizado 100  $\mu L$  de  $H_3PO_4$ , se mostrou mais próximo ao perfil do padrão (A) do que o (E) que não havia adição de  $H_3PO_4$ .

Por fim, pode-se dizer que ao submeter à solução de  $LiOH$  4,0 mol  $L^{-1}$  às condições ideais de neutralização/precipitação, esse método de preparo se mostrou promissor. Porém ao realizar a hidrólise, o ruído se tornou maior impossibilitando a quantificação dos analitos, tanto amostra quanto padrão. Ainda, ao utilizar o extrato da hidrólise fortificado com padrões, nota-se melhoria do perfil do eletroferograma do extrato cuja força iônica é reduzida. Assim, seria necessária maior investigação sobre os efeitos da hidrólise na quantificação dos analitos.

Figura 20. Eletroferogramas comparando (A) padrão 50 mg L<sup>-1</sup> com os extratos pós hidrólise de banana: (B) pH 12,86, (C) pH 12,4, (D) pH 6,37; (E) ponto B diluído com padrões, (F) ponto C diluído com padrões e (G) ponto D diluído com padrões. Condições de separação: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,0, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.3.3.2 Hidrólise ácida – neutralização/precipitação com Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

De forma análoga ao realizado na hidrólise básica, para ajuste de pH e de força iônica do meio reacional, na hidrólise ácida foram adicionadas a uma solução de HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> massas de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Esse aditivo possibilita neutralizar o H<sup>+</sup> proveniente do ácido e precipitar AgCl, como mostrado na Equação 10. Em cada uma dessas adições foi realizada medida de pH e corrente, cujos resultados são mostrados na Tabela 17 e na Figura 21.

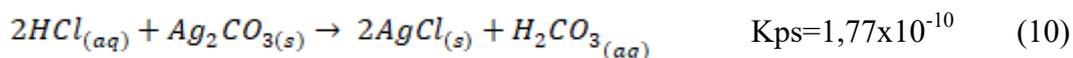
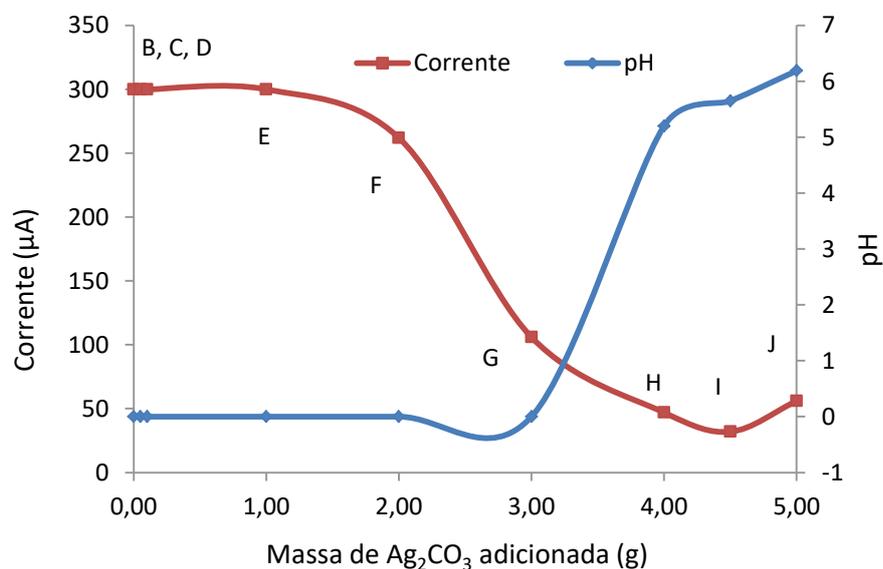


Tabela 17. Valores da variação de pH e corrente observadas para cada massa de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  adicionada a 5 mL solução de  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ , para cada um dos pontos estudados.

Ponto	Massa adicionada de $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ (g)	pH	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
B	0,00		300
C	0,05		300
D	0,10		300
E	1,00	~zero	300
F	2,00		262
G	3,00		106
H	4,00	5,20	47
I	4,50	5,65	32
J	5,00	6,19	56

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 21. Variação de pH e corrente observadas para cada massa de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  adicionada à solução de  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

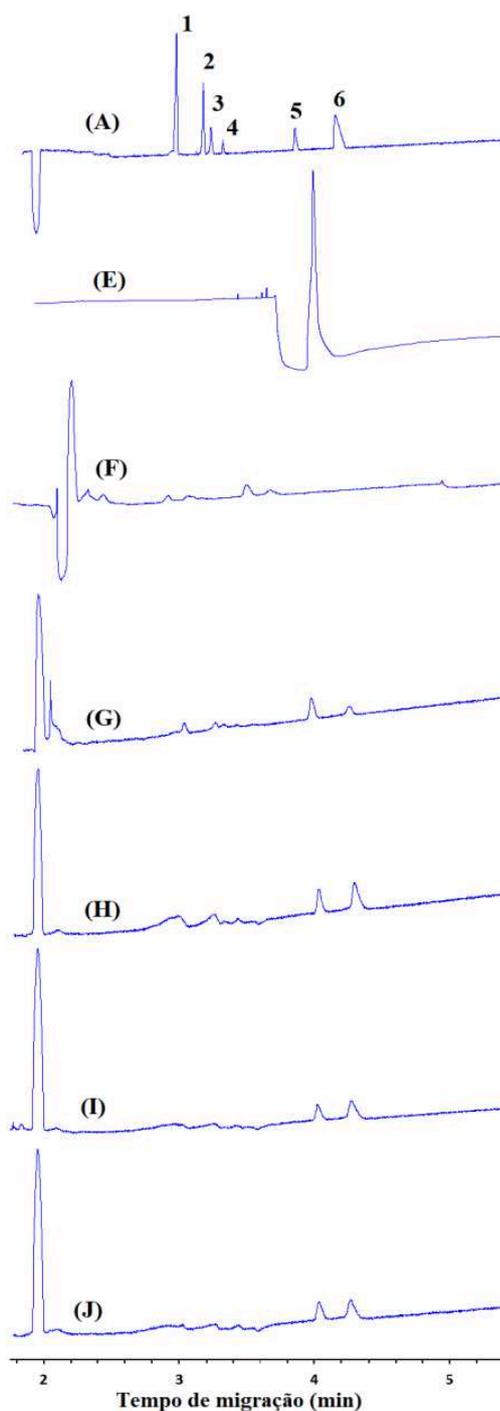
De acordo com a na Tabela 17 e a Figura 21, pode-se notar que a cada adição de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  ocorre aumento de pH e redução de corrente até o ponto em que o pH continua em

ascensão, porém a corrente começa a aumentar novamente (ponto J). Assim, muito provavelmente a condição ideal está a partir do ponto H, uma vez que a partir desse ponto o pH é maior e a corrente e a força iônica são menores, o que colabora para o melhor perfil da separação.

A cada um dos pontos avaliados, a partir do ponto E, pois os pontos B, C e D não diferem nos valores de corrente e pH, foi obtido um eletroferograma, com adição de uma solução padrão para comparar o comportamento do perfil de separação nas diferentes condições de força iônica, assim como para definir o ponto ótimo de adição de ácido na neutralização/precipitação a ser utilizado nas amostras. Tais resultados são mostrados na Figura 22.

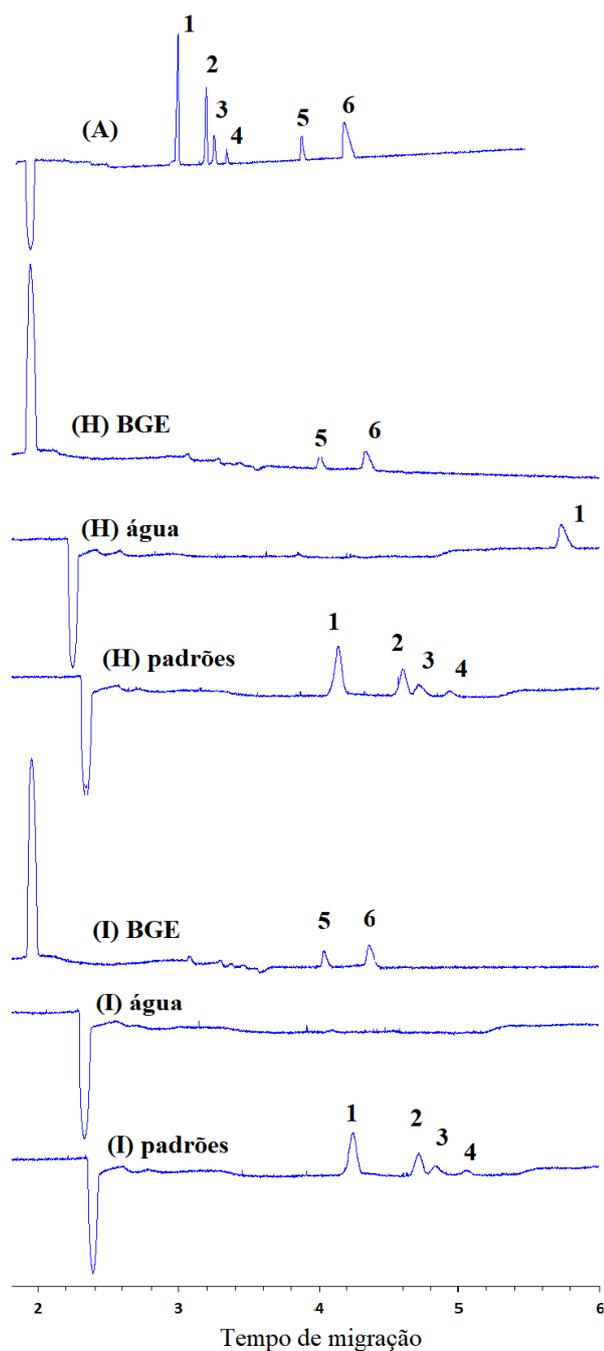
Segundo os eletroferogramas mostrados na Figura 22, no caso da solução utilizada na hidrólise ácida, nem os pontos esperados e nenhum outro avaliado demonstrou perfil condizente com o esperado. Na tentativa de melhorar o perfil, reduzindo a força iônica, os pontos (H) e (I) foram diluídos usando fator de diluição de 20 vezes em BGE, em água e em solução de padrões (concentração final  $50\text{mg L}^{-1}$ ), os resultados são expostos na Figura 23.

Figura 22. Comparação do perfil de separação para cada uma das condições avaliadas na solução utilizada em hidrólise ácida e padrão: (A) solução padrão 50 mg L<sup>-1</sup>, (E) ponto E, (F) ponto F, (G) ponto G, (H) ponto H e (I) ponto I. Condições de separação: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,0, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 μm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3- His, 4- Met, 5- PI, 6- Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 23. Comparação do perfil de separação: (A) solução padrão 50 mg L<sup>-1</sup>, (H) ponto H diluído 20 vezes em BGE, em água e em solução de padrões (concentração final 50mg L<sup>-1</sup>), (I) ponto I diluído 20 vezes em BGE, em água e em solução de padrões (concentração final 50mg L<sup>-1</sup>). Condições de separação: BGE: butilamina 70 mmol L<sup>-1</sup> e MOPS 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 11,00, injeção +30kV, 50mbar, 7s, capilar de 50 µm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo, detecção em 210 nm. Legenda: 1- Trp, 2- Phe, 3-His, 4- Met, 5- PI, 6-Tyr.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os eletroferogramas mostrados na Figura 23, não foram conclusivos para identificar o ponto o mais indicado para a análise, pois para os pontos (H) e (I) para diluição com BGE e com padrões apresentaram perfis similares, já usando diluição com água, o ponto (H) se mostrou melhor, apesar do atraso no tempo de migração dos analitos, porque apareceu sinal de um analito no tempo de análise proposto. Porém, nenhum dos pontos foi suficiente para conhecer a condição mais adequada, sendo necessária maior investigação para essa proposta de neutralização/precipitação após a hidrólise ácida.

#### 4.4 COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS

A Tabela 18 apresenta um resumo com as principais características de alguns métodos que envolvem a análise de aminoácidos, tais como tipo de amostra, preparo de amostra, AA analisados, técnica empregada, tempo de análise, faixa linear, LOD, LOQ, precisão e recuperação.

Conforme exposto na Tabela 18, pode-se notar a diversidade de amostras em que a determinação de aminoácidos pode ser aplicada, assim como os diferentes preparos de amostra e técnicas utilizadas nessas análises.

Ao comparar o método proposto neste estudo aos demais citados na Tabela 18, os quais envolvem diferentes técnicas, tipos de amostras, número de aminoácidos analisados é possível notar que o método desenvolvido apresenta vantagens quanto ao tempo de análise que é de aproximadamente 5,5 minutos para análise simultânea de Trp, Phe, His, Met e Tyr, baixo custo e não necessita de etapa de derivatização. Além disso, apresenta todas as vantagens já mostradas ao utilizar a técnica de Eletroforese Capilar, tais como, uso de baixos volumes, proporcionando benefícios não somente com relação aos custos, mas também a questões ambientais, pois ocasiona redução na geração de resíduos. Porém, há desvantagens como maiores valores de LD e LQ, o que em algumas matrizes não é crítico, visto que os aminoácidos estão presentes em altas quantidades, da ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ . Além disso, o método necessita de alguns ajustes para a aplicação em determinadas amostras de alimentos e medicamentos.

Tabela 18. Alguns métodos utilizados na determinação de aminoácidos, com suas principais características.

Tipo de amostra	Preparo de amostra	AA analisados	Técnica empregada	Tempo (min)	Faixa linear mg L <sup>-1</sup>	LOD mg L <sup>-1</sup>	LOQ mg L <sup>-1</sup>	Rec (%)	Referência
Batata, berinjela, grão de bico, farinha de trigo e farinha de sorgo	Hidrólise, derivatização com 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-Cl)	Pro, Val, Glu, Ala, Asp, Ser	CE-UV	10	2,5 - 40	0,32 - 0,56	1,06 - 1,89	85 - 108	(OMAR; ELBASHIR; SCHMITZ, 2017)
Cereais (flocos de milho, arroz e trigo)	Hidrólise, diluição	Phe, Trp, His, Tyr	CE-UV (MECK)	2,5	2,5 - 43,2	0,25 - 2,5	1,0 - 7,0	80 - 110	(VALESE, 2012)
Pólen de abelha e geléia	Hidrólise básica, ajuste pH e diluição	Trp	HPLC-Fluorescência Cromatografia Fluido	15	6,25x510 <sup>-3</sup>	3x10 <sup>-6</sup>	1,2x10 <sup>-5</sup>	92,5 - 100,5	(ZHANG et al., 2009)
Suplementos alimentares	Pesagem e diluição	Phe, Tyr, Trp	Supercrítico, separação enantiomérica	15	0,015 - 0,3	5x10 <sup>-4</sup> - 2x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup> - 6,7x10 <sup>-3</sup>	89,8 - 98,1	(SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016)
Resina de castanha-do-brasil.	Diferentes procedimentos de hidrólise (ácida e básica) e catalisados por resina trocadora de cátions	Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, Leu, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	CE-ESI-MS	10	3 - 80	16 - 172 μmol L <sup>-1</sup>	VNI	VNI	(COLNAGHI SIMIONATO et al., 2008)
Amostras biológicas	HF-SPME e HF-SBSE	Gly, Met, Tyr, Trp	GC-MS	12	10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-1</sup>	3x10 <sup>-7</sup> - 6,7x10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup> - 5x10 <sup>-5</sup>	71,8 - 102,3	(LI et al., 2016)
Soluções parenterais	Diluição	Trp, Phe, His, Met, Tyr	CE-UV	5,5	5 - 100	0,1 - 0,7	0,3 - 2,3	80 - 109	Método proposto
Hepatoprotetores	Diluição	Met	CE-UV	4,5	5 - 100	0,7	2,3	82 - 107	Método proposto

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

## 5 CONCLUSÃO

Ao longo do desenvolvimento do método, a utilização do *software PeakMaster*<sup>®</sup> se mostrou uma ferramenta útil, uma vez que os resultados experimentais obtidos com as mesmas condições das simulações foram bastante similares. Além de possibilitar a minimização do número de experimentos necessários nessa etapa. O padrão interno selecionado para a correção da área dos analitos se mostrou eficiente e importante, pois reduz o erro associado à injeção e diferentes análises.

A verificação do comportamento do BGE ao longo de análises consecutivas possibilitou inferir que depois de certo número de análises, ocorre comigração e posterior inversão dos dois últimos sinais avaliados, além disso, o BGE armazenado em vial com maior capacidade de volume se mostrou resistente a maior número de injeções consecutivas sem ocorrência de eletrólise. Ainda foi possível constatar a necessidade de troca do BGE a cada 40 análises consecutivas.

O melhor tempo de injeção encontrado ao avaliar altura e resolução de picos foi de 7s. O método proposto foi validado conforme os protocolos de validação recomendados por ICH, AOAC e ANVISA, mostrando-se adequados em todos os parâmetros avaliados.

A análise de amostras de solução parenteral utilizando o método desenvolvido se mostrou promissora para os analitos triptofano, fenilalanina e metionina, sendo necessárias maiores avaliações principalmente para os analitos histidina e tirosina, pois apresentaram resultados discrepantes ao comparar com o valor declarado no rótulo, possivelmente devido ao tempo não recomendado de armazenamento em geladeira dessas amostras após abertas, do alto fator de diluição usado, além de se encontrarem próximo ao fim do seu período máximo de validade.

Ao aplicar o método para medicamentos contendo metionina, foi possível realizar a quantificação de uma das três amostras investigadas.

Para análise de banana, os estudos do preparo de amostras na etapa de neutralização /precipitação precisam ser aprimorados para aplicação após as hidrólises ácidas e básicas, pois em solução demonstram potencial redução de força iônica colaborando para o perfil de separação dos analitos.

Por fim, pode-se concluir que o método pode ser utilizado desde que aprimorado como uma alternativa de método rápido e prático a ser implementado no controle de qualidade que envolvem os aminoácidos do estudo.

## REFERÊNCIAS

ALI, T.; AKHTAR, A.; GOHAIN, N. Analysis of amino acids network based on distance matrix. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 452, p. 69–78, 2016.

ANVISA. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde . Aprovar o regulamento técnico referente a alimentos para praticantes de atividade física. Portaria n ° 222, de 24 de março de 1998

ANVISA. Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE n ° 899, de 29 DE MAIO DE 2003 12 de março de 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>.

ANVISA. Processo de construção da tabela. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

ANVISA. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fica aprovado o regulamento técnico que estabelece os requisitos para o registro e a renovação de registro de medicamentos específicos. Resolução RDC n° 24, de 14 de junho de 2011.

ANVISA. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a obrigatoriedade das empresas informarem à ANVISA a quantidade de fenilalanina, proteína e umidade de alimentos, para elaboração de tabela do conteúdo de fenilalanina em alimentos, assim como disponibilizar as informações nos sítios eletrônicos das empresas ou serviço de atendimento ao consumidor (SAC). Resolução RDC n° 19, de 5 de maio de 2010

AOAC. **Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. 2016

ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Amino Acids: Determination. In: **Encyclopedia of Food and Health**. p. 141–148.

ARTURO, E. C. et al. First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2394–2399, 1 mar. 2016.

BANDERET, L. E.; LIEBERMAN, H. R. Treatment with tyrosine, a neurotransmitter precursor, reduces environmental stress in humans. **Brain Research Bulletin**, v. 22, n. 4, p. 759–762, abr. 1989.

BARRETT, G. C. **Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985.

BETTA, F. DELLA. **Desenvolvimento e Validação de Método Rápido para Determinação Simultânea de Nitrato e Nitrito em Alimentos Infantís Utilizando Eletroforese Capilar**. UFSC, 2014.

BITTAR, C; et al. TIROSINEMIA TIPO 1no Sul do Brasil: Experiência do Serviço de

Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). **VI congresso brasileiro de triagem neonatal / XXII congresso brasileiro de genética médica**, 2010.

BOQUÉ, R. et al. Validation of analytical methods. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 1, p. 128–143, 2002.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CHECA-MORENO, R. et al. Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 22, p. 3817–3828, 2008.

COLNAGHI SIMIONATO, A. V. et al. Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures. **Electrophoresis**, v. 29, n. 10, p. 2051–2058, 2008.

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

DA SILVA, J. A. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys**, v. 2013, p. 1–22, 2012.

DAUNER, M.; SAUER, U. GC-MS Analysis of Amino Acids Rapidly Provides Rich Information for Isotopomer Balancing. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 4, p. 642–649, 2000.

DE ARAÚJO, W. A. G.; DE ASSIS JR, F. I.; SOBREIRA, G. F. Revista Eletrônica Nutritime 395. **Nutritime**, v. 4, n. 2, p. 395–404, 2007.

DE JONG, W. H. A. et al. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 7, p. 603–609, 2009.

DE LUCIA, S. et al. An unfortunate challenge: Ketogenic diet for the treatment of Lennox–Gastaut syndrome in tyrosinemia type 1. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 20, n. 4, p. 674–677, jul. 2016.

DE OLIVEIRA, A. M. C. **Workshop de Validação de Metodologia Analítica**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>.

DEMIRBAS, D.; BRUCKER, W. J.; BERRY, G. T. Inborn Errors of Metabolism. **Clinics in Perinatology**, v. 42, p. 413–439, 2015.

DRÖGE, W. Oxidative stress and ageing: Is ageing a cysteine deficiency syndrome? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2355–2372, 2005.

EISENSMITH, R. C.; WOO, S. L. C. Molecular Basis of Phenylketonuria and Related Hyperphenylalaninurias : Mutations and Polymorphisms in the Human Phenylalanine. v. 23, p. 13–23, 1992.

EL-HATTAB, A. W. Inborn Errors of Metabolism. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 2, p. 413–439, 2015.

FUKUMOTO, K.; YOSHIKAWA, M.; OHNO, H. Room Temperature Ionic Liquids from 20 Natural Amino Acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 8, p. 2398–2399, 2005.

GUNST, J. et al. Amino acid supplements in critically ill patients. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 127–131, 2018.

HAN, Y.; CHEN, Y. On-column labeling technique and chiral CE of amino acids with mixed chiral selectors and UV detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 15, p. 2765–2770, 2007.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; GUARDIA, M. DE LA. Current advancement in electrochemical analysis of neurotransmitters in biological fluids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 107–121, 2017.

HOMENS E INSTITUIÇÕES - Prêmios Nobel de 1948. **CIÊNCIA E CULTURA**, v. 62, n. 1, p. 46–50, 2010.

HUTTENLOCHER, P. R. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. **European Journal of Pediatrics**, v. 159, n. S2, p. S102–S106, 2000.

ICH. **ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)>. Acesso em: 20 ago. 2017.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

ISLAM, J. et al. Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. **Food Bioscience**, v. 13, p. 56–59, 2016.

JAROŠ, M. et al. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: II. Computer simulation and comparison with experiments. **Electrophoresis**, v. 23, n. 16, p. 2667–2677, 2002.

JOHNS, K. F. et al. Evaluation of Peakmaster for computer-aided multivariate optimisation of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental data. **Electrophoresis**, v. 30, n. 5, p. 839–847, 2009.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298–1302, 1981.

KANO, M. et al. Decreased histamine H1 receptor binding in the brain of depressed patients. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 3, p. 803–810, 2004.

KHOSRAVI, H. et al. Methionine requirement of growing Japanese quails. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 122–128, 2016.

KIM, J.; BOUTIN, M. A List of Phenylalanine to Protein Ratios for Common Foods. **ECE Technical Reports**, p. 456, 2014.

LESCH, K. P. et al. Targeting brain serotonin synthesis: Insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2426–2443, 2012.

LI, J. et al. Hollow fiber – stir bar sorptive extraction and microwave assisted derivatization of amino acids in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1474, p. 32–39, 2016.

MANIG, F. et al. The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy. **Journal of Biotechnology**, v. 242, p. 30–54, 2017.

MANOEL, R. V. G. **Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Cátions Inorgânicos em Leites, Nitrito e Nitrato em Alface e Histamina em Peixes Utilizando Eletroforese Capilar**. UFSC, 2011.

MARCOS, J. et al. Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 91–101, 2016.

MCPHERSON, R. A.; HARDY, G. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 562–568, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**.

MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. **Analytical Biochemistry**, v. 189, n. 2, p. 223–230, 1990.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. ed.

OMAR, M. M. A.; ELBASHIR, A. A.; SCHMITZ, O. J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. **Food Chemistry**, v. 214, p. 300–307, 2017.

OTASEVIC, V.; KORAC, B. Amino Acids: Metabolism. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 149–155, 2016.

OVERVIEW, I. Amino Acids. **Amino Acids**, 2003.

**PeakMaster 5.3.** , 2011.

PÉREZ-MÍGUEZ, R.; MARINA, M. L.; CASTRO-PUYANA, M. Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 97–114, 2016.

PERSSON, J.; NÄSHOLM, T. A GC-MS method for determination of amino acid uptake by plants. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 352–358, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBAROVA, F. **Amino Acids : Carriers of Nutritional and Biological Value Foods**. Elsevier Inc., 2018.

RIBEIRO, F. A. DE L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de Validação: Uma Nova Ferramenta para estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 563–575, 2008.

RUIZ-ANGEL, M. J. et al. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 2–9, 2014.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L. et al. Chiral analysis of aromatic amino acids in food supplements using subcritical fluid chromatography and Chirobiotic T2 column. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 519–525, 2016.

SASAHARA, I. et al. The effect of histidine on mental fatigue and cognitive performance in subjects with high fatigue and sleep disruption scores. **Physiology and Behavior**, v. 147, p. 238–244, 2015.

SELVARAJ, S. et al. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 233–245, 2014.

**Servier**. Disponível em: <<https://smart.servier.com/>>.

SHAH, V. P. et al. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 3, p. 309–312, 1992.

**Sigma Aldrich**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

SILVA, M. **Desenvolvimento de Método para Análise de Nitrato, Nitrito e Tiocianato em**

**Amostras de Leite e Extrato Hidrossolúvel de Soja por Eletroforese Capilar de Zona, Empregando Capilar de Sílica Revestido com Sal de Quitosana Quaternizada**, UFSC, 2017.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed.

SPITZ, H. D. Approach Hydrolyzates for Sample for Amino Preparation Acid of Protein. **Analytical Biochemistry**, v. 73, p. 66–73, 1973.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2–3, p. 75–88, 1998.

TASHIRO, M. et al. **Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: Functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain**. Life Sciences. 2002.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1995.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, 2004.

UNGER, N.; HOLZGRABE, U. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 125–139, 2018.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mundi**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2007.

VALESE, A. C. **Desenvolvimento, Otimização e Validação de Método Rápido para Análise Simultânea de Fenilalamina, Triptofano, Histidina e Tirosina em Cereais por Cromatografia Eletrocínética Micelar**. UFSC, 2012.

VAN DER GOOT, A. T.; NOLLEN, E. A. A. Tryptophan metabolism: Entering the field of aging and age-related pathologies. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 336–344, 2013.

VAZ, F. A. S. et al. Fundamentos de Eletroforese Capilar: Uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.

VITALI, L. **Preparação, Caracterização e Aplicação de Capilares Modificados com Quitosana e Sal de Quitosana Quaternizada em Eletroforese Capilar**. UFSC, 2012.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica Estrutura e Função**. 4. ed.

WÄTZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. In: **Separation**

**Science and Technology**, v. 9p. 225–244.

WIEDERSCHAIN, G. Y. Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques (3rd Edn.). **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 12, p. 1350–1350, 2008.

WILLIAMS, K.; HAZELL, P. Selective serotonin reuptake inhibitors for autism spectrum disorders. **Journal of Evidence-Based Medicine**, v. 3, n. 4, p. 231–231, 2010.

XU, X. et al. Dynamic pH junction-sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 980, p. 20–27, 2015.

YANAI, K.; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 1–15, 2007.

YOUNG, S. N.; LEYTON, M. The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 4, p. 857–865, 2002.

ZHANG, J. et al. Determination of tryptophan in bee pollen and royal jelly by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 9, p. 994–998, 2009.

ZHENG, G. et al. A novel method for detecting amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p. 1–6, 2015.

ZOPPA, M. et al. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 831, n. 1–2, p. 267–273, 2006.