



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Thais de Oliveira

**Determinação de colágeno em produtos cárneos por  
espectrometria de absorção molecular**

Florianópolis

2025

Thais de Oliveira

**Determinação de colágeno em produtos cárneos por  
espectrometria de absorção molecular**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof.(a) Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.

Coorientador: Rodrigo Barcellos Hoff, Dr.

Florianópolis

2025

de Oliveira, Thais

Determinação de colágeno em produtos cárneos por espectrometria de absorção molecular / Thais de Oliveira ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa, coorientador, Rodrigo Barcellos Hoff, 2025.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. adaptação de método. 3. digestão assistida por micro-ondas. 4. hidroxiprolina. 5. verificação de método. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira. II. Hoff, Rodrigo Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Thais de Oliveira

**Determinação de colágeno em produtos cárneos por  
espectrometria de absorção molecular**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 07 de julho de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Heitor Daguer, Dr.

Ministério da Agricultura e Pecuária

Prof.<sup>a</sup> Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Ciência dos Alimentos

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2025.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Mari e Marcelo, e ao meu parceiro de vida, Bruno, pelo apoio durante toda a minha jornada acadêmica. Obrigada por todos os momentos de colo, abraços, cuidados e compreensão que foram fornecidos a mim durante todos esses anos.

Às minhas amigas e parceiras de bancada Andressa Spricigo e Samantha Gonçalves, pelo apoio incondicional durante todas as etapas do desenvolvimento desta dissertação. Vocês foram fundamentais em todos os momentos, desde os mais difíceis até os mais felizes. Obrigada pelos abraços a cada etapa concluída com sucesso.

Agradeço à minha querida amiga, Ana Zapelini, por todas as orientações, sugestões, correções e dúvidas tiradas ao longo dessa jornada. Você é um presente.

À professora Ana Costa, pela orientação deste trabalho e suporte fornecido durante esses anos.

A Rodrigo Hoff, pela coorientação deste trabalho. Obrigada pelo esforço incansável, pelos inúmeros áudios trocados e pela dedicação para tornar possível a realização deste trabalho. Você transborda paixão pela ciência e é inspirador.

A Heitor Daguer, por sua dedicação, auxílio e orientações para o desenvolvimento deste trabalho, e em especial pelas contribuições que tem feito à área de alimentos durante toda a sua carreira profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, por propiciar a minha formação acadêmica e a de inúmeros profissionais brasileiros.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul, por meio do Setor Laboratorial Avançado em Santa Catarina (SLAV-SC) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), pela disponibilização de toda a estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do SLAV-SC, em especial a Luciano Molognoni, por todo o conhecimento, ajuda e encorajamento.

Aos membros da banca examinadora, professora Renata Amboni e Heitor Daguer, pelas contribuições dadas para o refinamento deste estudo.

A todos que de alguma forma participaram e me auxiliaram no desenvolvimento desta dissertação, meu profundo agradecimento.

*“A única luta que se perde é a que se  
abandona*

*E nós nunca*

*Nunca abandonamos luta”*

*(Don L)*

## RESUMO

Em 2022, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) definiu em seus Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQs) para apresuntado, fiambre, hambúrguer e presunto, pela primeira vez, limites regulatórios máximos permitidos para colágeno. O colágeno, a principal proteína estrutural do tecido conjuntivo, desempenha um papel fundamental na textura, capacidade de retenção de água e vida útil de produtos cárneos. Este estudo teve como objetivo verificar e adaptar o método normalizado AOAC-NMKL n° 990.26/127 para a determinação de colágeno, baseado na determinação de hidroxiprolina (Hyp), incorporando a digestão assistida por micro-ondas (DAM) como uma alternativa mais rápida e sustentável. Após a hidrólise, a Hyp foi oxidada com cloramina-T e reagiu com 4-dimetilaminobenzaldeído para quantificação espectrofotométrica em 558 nm. O desempenho do método normalizado foi avaliado utilizando diversas matrizes cárneas (presuntos, salsichas e hambúrgueres), com resultados de linearidade ( $R^2 = 0,9990$ ), repetibilidade e precisão intermediária ( $CV \leq 8,8\%$ ), exatidão (recuperações de 103–104%), limite de quantificação ( $LQ = 0,60 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) e incerteza de medição ( $U = 4,6\%$ ) adequados. Um método de hidrólise alternativo por meio de digestão ácida assistida por micro-ondas foi otimizado e comparado ao protocolo AOAC-NMKL. O protocolo DAM utilizando  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$  reduziu o volume utilizado de ácido em 67% e o tempo de digestão em mais de 96% em comparação com o método AOAC-NMKL. Essas melhorias, combinadas com o uso de reagentes menos perigosos e a redução no volume de resíduos gerados, estão alinhadas com os princípios da Química Analítica Verde. De modo geral, o método proposto mostrou-se eficiente e ambientalmente favorável, representando uma alternativa rápida e valiosa para a determinação de colágeno em análises de rotina de produtos cárneos.

**Palavras-chave:** adaptação de método; digestão assistida por micro-ondas; hidroxiprolina; verificação de desempenho de método.

## ABSTRACT

In 2022, the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA) defined new regulations (RTIQs) for cooked ham, hamburger, and luncheon, setting for the first time, regulatory limits for the addition of collagen. Collagen, the primary structural protein in connective tissue, plays a key role in the texture, water-holding capacity, and shelf life of meat products. This study aimed to verify and adapt the AOAC-NMKL 990.26/127 reference method for collagen determination, based on hydroxyproline (Hyp) determination, by incorporating microwave-assisted digestion (MAD) as a faster and more sustainable alternative. Following hydrolysis, Hyp was oxidized with chloramine-T and reacted with 4-dimethylaminobenzaldehyde for spectrophotometric detection at 558 nm. Method verification was conducted using various meat matrices (cooked hams, cooked sausages, and hamburgers), achieving proper linearity ( $R^2 = 0.9990$ ), repeatability and intermediate precision ( $CV \leq 8.8\%$ ), accuracy (recoveries of 103–104%), limit of quantification ( $LOQ = 0.60 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ), and measurement uncertainty ( $U = 4,6\%$ ). An alternative hydrolysis method via microwave-assisted acid digestion was suggested, which was optimized and compared with the AOAC-NMKL protocol. The MAD protocol using HCl reduced acid volume by 67% and digestion time by more than 96% compared to the AOAC-NMKL method. These improvements, combined with the use of less hazardous reagents and the reduction in the volume of waste generated, align with the principles of Green Analytical Chemistry. Overall, the proposed method proved to be efficient and environmentally favorable, representing a valuable alternative for the determination of collagen in routine analysis of meat products.

**Keywords:** method adaptation; microwave assisted digestion; hydroxyproline; method performance verification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais constituintes do colágeno. ....	22
Figura 2 – Estrutura da fibra de colágeno.....	23
Figura 3 – Solução resultante da hidrólise com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup> por 16 h para análise de colágeno em produtos cárneos. ....	29
Figura 4 – Princípios da Química Analítica Verde, de acordo com Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski (2020).....	39
Figura 5 – Gráfico do estudo de linearidade, com as três curvas de calibração analisadas .....	52
Figura 6 – Gráfico de distribuição dos resíduos das curvas de calibração para análise de hidroxiprolina. ....	53
Figura 7 – Gráfico das contribuições de incerteza de medição do método verificado ...	60
Figura 8 – Comparação entre o teor verde das hidrólises realizadas de acordo com o método tradicional AOAC-NMKL e pela digestão assistida por micro-ondas por meio do <i>software</i> AGREE. ....	68
Figura 9 – Comparação entre o teor verde das hidrólises realizadas de acordo com o método tradicional AOAC-NMKL e pela digestão assistida por micro-ondas por meio do <i>software</i> AGREEprep. ....	69
Figura 10 – Comparação dos <i>scores</i> , por critério, das hidrólises realizadas pelos métodos AOAC-NMKL e digestão assistida por micro-ondas (DAM), gerados pelo <i>software</i> AGREE.....	70
Figura 11 - Comparação dos <i>scores</i> , por critério, das hidrólises realizadas pelos métodos AOAC-NMKL e digestão assistida por micro-ondas (DAM), gerados pelo <i>software</i> AGREEprep.....	71

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definição e limites regulatórios de produtos cárneos com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estabelecido para análise de colágeno. ....	26
Quadro 2 – Questões relacionadas ao impacto ambiental de um método analítico. ....	40
Quadro 3 – Critérios adotados para a estimativa do caráter verde de métodos analíticos de acordo com os <i>softwares</i> AGREE e AGREEprep. ....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos analíticos para determinação de colágeno em carnes e produtos cárneos, incluindo informações de matriz, quantidade de amostra, tipo de hidrólise, métodos de preparo, métodos analíticos, teor de hidroxiprolina e/ou colágeno e parâmetros de desempenho.....	31
Tabela 2 - Avaliação do valor encontrado para cada parâmetro avaliado frente ao critério de aceitabilidade proposto, estabelecido pelo Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008, revisão 08) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). ....	51
Tabela 3 – Resultados do estudo de repetibilidade para a determinação de hidroxiprolina em produtos cárneos por espectrometria molecular (valores expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). .	53
Tabela 4 – Resultados do estudo de precisão intermediária para a determinação do teor de hidroxiprolina em produtos cárneos por espectrometria molecular (valores expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).....	55
Tabela 5 – Resultados do desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) e razão de Horwitz (HorRat) calculados para o estudo de precisão intermediária. ....	55
Tabela 6 – Resultados das variâncias das três amostras analisadas por duas analistas, em dias diferentes, por meio de teste-F.....	56
Tabela 7 – Recuperação analítica após análise de diferentes níveis de concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) em solvente.....	57
Tabela 8 – Exatidão (z-scores intralaboratoriais) após análise de hidroxiprolina em amostras fornecidas para comparação interlaboratorial. ....	57
Tabela 9 – Estudo de precisão e exatidão do limite de quantificação de hidroxiprolina.	58
Tabela 10 – Estudo de aplicabilidade e confiabilidade do método utilizando diferentes matrizes.....	59
Tabela 11 – Fontes de incerteza de medição e incerteza-padrão do método verificado para determinação de colágeno em produtos cárneos por espectrometria molecular .....	60
Tabela 12 – Comparação entre os resultados obtidos no estudo colaborativo AOAC-NMKL e na implementação do referido método no presente trabalho. ....	61
Tabela 13 – Resultados da determinação de Hyp ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) comparando o método normalizado AOAC-NMKL e a digestão assistida por micro-ondas utilizando ácido clorídrico ou sulfúrico. ....	62

Tabela 14 – Resultados da determinação de Hyp ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) comparando as aberturas utilizando $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 5 \text{ mol L}^{-1}$ . .....	63
Tabela 15 – Resultados do estudo de aplicabilidade para apresuntado, presunto e hambúrguer: comparação dos métodos AOAC-NMKL e DAM utilizando $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e conformidade dos produtos de acordo com as legislações brasileiras.....	65
Tabela 16 – Composição dos produtos cárneos analisados em relação aos ingredientes, teores proteico, de gordura e de carboidratos presentes nas amostras, em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC-NMKL Método normalizado da AOAC *International* nº 990.26, desenvolvido em conjunto com o estudo colaborativo nº 127 conduzido pelo *Nordic-Baltic Committee on Food Analysis* (NMKL)

CV	Coefficiente de variação
DAM	Digestão assistida por micro-ondas
DRRR	<i>Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenz-materialien</i>
Gly	Glicina
Hyp	Hidroxiprolina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de detecção
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LQ	Limite de quantificação
LR	Limite regulatório
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
NMKL	<i>Nordic-Baltic Committee on Food Analysis</i>
Pro	Prolina
PTFE	Politetrafluoretileno
QAV	Química Analítica Verde
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SLAV-SC	Setor Laboratorial Avançado em Santa Catarina
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>COLÁGENO: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE</b> .....	<b>20</b>
3.1.	APLICAÇÕES DO COLÁGENO .....	24
3.2.	COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	25
<b>4</b>	<b>LEGISLAÇÃO BRASILEIRA</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO</b> ....	<b>27</b>
5.1.	MÉTODO AOAC-NMKL .....	28
<b>5.1.1.</b>	<b>Hidrólise e obtenção do extrato de leitura</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Complexação</b> .....	<b>29</b>
5.2.	TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	30
5.3.	HIDRÓLISE ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS .....	35
<b>5.3.1.</b>	<b>Uso e vantagens da digestão assistida por micro-ondas na análise de alimentos</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>QUÍMICA ANALÍTICA VERDE</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
7.1.	PADRÕES E REAGENTES .....	42
7.2.	AMOSTRAS .....	42
7.3.	VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO AOAC-NMKL .....	43
<b>7.3.1.</b>	<b>Procedimento experimental</b> .....	<b>43</b>
<b>7.3.2.</b>	<b>Parâmetros avaliados</b> .....	<b>44</b>
7.3.2.1.	<i>Linearidade</i> .....	45
7.3.2.2.	<i>Precisão</i> .....	45
7.3.2.2.1.	Repetibilidade .....	45
7.3.2.2.2.	Precisão intermediária .....	46
7.3.2.3.	<i>Exatidão</i> .....	47
7.3.2.3.1.	Recuperação .....	47
7.3.2.3.2.	<i>Z-score</i> intralaboratorial .....	47
7.3.2.4.	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	47
7.3.2.5.	<i>Garantia da validade dos resultados</i> .....	48

7.3.2.6.	<i>Avaliação da incerteza de medição</i> .....	48
7.4.	ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE HIDRÓLISE .....	49
7.4.1.	<b>Procedimento experimental</b> .....	49
7.4.2.	<b>Comparação dos métodos de hidrólise</b> .....	50
7.5.	AVALIAÇÃO DA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE.....	50
<b>8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
8.1.	VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO AOAC-NMKL .....	51
8.1.1.	<b>Linearidade</b> .....	52
8.1.2.	<b>Precisão</b> .....	53
8.1.2.1.	<i>Repetibilidade</i> .....	53
8.1.2.2.	<i>Precisão intermediária</i> .....	54
8.1.3.	<b>Exatidão</b> .....	56
8.1.3.1.	<i>Recuperação</i> .....	56
8.1.3.2.	<i>Z-score intralaboratorial</i> .....	57
8.1.4.	<b>Limites de detecção e quantificação</b> .....	58
8.1.5.	<b>Garantia da validade dos resultados</b> .....	58
8.1.6.	<b>Avaliação da incerteza de medição</b> .....	59
8.1.7.	<b>Dados da verificação de desempenho</b> .....	61
8.2.	ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE HIDRÓLISE .....	62
8.2.1.	<b>Comparação entre métodos de hidrólise</b> .....	62
8.3.	QUÍMICA ANALÍTICA VERDE .....	67
8.3.1.	<b>Critérios do <i>software</i> AGREE</b> .....	69
8.3.2.	<b>Critérios do <i>software</i> AGREEprep</b> .....	71
	<b>COSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne do mundo, devido à qualidade e segurança sanitária apresentadas pelos produtos fabricados no país, as quais são exigidas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). A obrigatoriedade da inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal e seus subprodutos foi estabelecida no Brasil no ano de 1950, pela Lei nº 1.283, de 18 de dezembro do mesmo ano. A fiscalização da conformidade desses produtos é realizada pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), pertencente ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), por meio do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Esse controle se estende da criação e abate dos animais ao comércio do produto final.

A legislação brasileira estabelece limites regulatórios (LRs) para o uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia na elaboração de produtos cárneos, visando a garantia da qualidade alimentar e segurança da população consumidora desses produtos. Os LRs mais recentemente estabelecidos pelo MAPA em seus Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQs) incluem, pela primeira vez, teor máximo de colágeno permitido em produtos cárneos (BRASIL, 2022a, 2022b, 2022c, 2023).

O colágeno é o maior representante proteico na estrutura do tecido conjuntivo animal, podendo ser obtido de cartilagens, peles, ossos, tendões, dentre outros tecidos e órgãos de diferentes espécies animais (Brasil, 2021a; Tang et al., 2022). Devido à grande variedade de tipos dessas proteínas, a aplicabilidade do colágeno é ampla, a qual inclui usos em: biomedicina, uma vez que possui propriedades relacionadas à formação de géis que auxiliam na recuperação de células; cosméticos, devido à capacidade de solubilidade e retenção de água; manufatura de biomateriais, por suas propriedades biomecânicas, biodegradáveis e de alta versatilidade; entre outras (Alam et al., 2022; Oliveira et al., 2021).

Outro importante campo de aplicação da proteína colagênica se dá na indústria de alimentos, onde pode ser utilizada como aditivo alimentar devido às suas propriedades funcionais, tais como: capacidade de absorção de água, emulsificante, estabilizante e de formação de géis (Alexandretti et al., 2019). Em produtos cárneos, pode atuar na extensão da vida de prateleira, funcionando como uma barreira contra o oxigênio (Antoniewski; Barringer, 2010), bem como melhorar o rendimento de cozimento, capacidade de retenção de água (Brewer, 2012) e, dependendo da quantidade, a textura dos produtos aos quais é aplicado (Li et al., 2022).

O colágeno é muito utilizado na formulação de produtos cárneos com a finalidade de aumentar o teor proteico e/ou as propriedades de ligação à água (Sentandreu; Sentandreu, 2014). Apesar de ser frequentemente utilizado, o colágeno é uma proteína de baixo teor de aminoácidos essenciais e, portanto, de menor valor nutricional (Anzani et al., 2020). Carnes consideradas de baixa qualidade nutricional são ricas em tecido conjuntivo e, dessa forma, podem ser avaliadas através de seu teor colagênico (Messia et al., 2008). A partir disso, torna-se necessário o controle de qualidade de produtos cárneos, visto que a presença de colágeno acima dos limites regulatórios estabelecidos pelo MAPA, além de configurar fraude por adulteração, pode reduzir o valor nutricional proteico do produto, comprometendo seu perfil de aminoácidos essenciais.

A determinação de colágeno em carnes e produtos cárneos é feita por meio de métodos de quantificação da 4-hidroxiprolina (Hyp), principal aminoácido presente exclusivamente no colágeno (Da Silva; Spinelli; Rodrigues, 2015). Essa quantificação pode ser realizada por meio do método normalizado da AOAC *International* nº 990.26, desenvolvido em estudo colaborativo conduzido pelo *Nordic-Baltic Committee on Food Analysis* (NMKL) com o método NMKL 127, que emprega hidrólise ácida seguida de complexação e determinação por espectrofotometria de absorção molecular na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Para fins de padronização, esse método será referido como AOAC-NMKL neste trabalho. A principal desvantagem desse método está relacionada ao tempo demasiadamente prolongado para a etapa de hidrólise.

O MAPA, por meio de seus Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs), especialmente no Setor Laboratorial Avançado em Santa Catarina (SLAV-SC), tem implementado métodos alternativos para análises de controle de produtos de origem animal, como análise de sulfito, nitrito e nitrato por eletroforese capilar de zona, determinação de conservantes e histamina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, dentre outros (De Melo et al., 2022; Della Betta et al., 2016; Deolindo et al., 2023; Gonçalves et al., 2022; Molognoni et al., 2019). Tais métodos têm sido empregados na rotina analítica do SLAV-SC para o Programa de Avaliação de Conformidade de Padrões Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal Comestíveis (PACPOA), uma vez que foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a frequência analítica, a precisão e a exatidão dos ensaios e reduzir o consumo de reagentes e insumos laboratoriais. Esses métodos alternativos têm sido frutos da parceria do SLAV-SC com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Com a implementação dos novos RTIQs para apresuntado, fiambre, hambúrguer e presunto, e com a definição de limites regulatórios para colágeno, essa análise passou a ser demandada pelo SIF para o PACPOA, mostrando-se necessária a disponibilidade de um método de quantificação viável e com elevada frequência analítica.

A partir disso, o objetivo deste estudo foi implementar o método normalizado da AOAC-NMKL para a determinação de colágeno em produtos cárneos, propondo adaptações na etapa de preparo de amostras, através de um sistema de digestão assistida por micro-ondas, visando o aumento da frequência analítica e a redução de resíduos químicos. O método de preparo de amostras adaptado teve seu desempenho verificado e foi comparado ao método normalizado AOAC-NMKL.

Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: na primeira parte, é apresentado o estado da arte sobre o tema, com base em revisão da literatura que abordou: (i) as principais características do colágeno, (ii) suas aplicações industriais – especialmente a de alimentos, (iii) legislação brasileira para o controle desse analito em produtos cárneos, (iv) os principais métodos analíticos empregados na determinação dessa proteína e, por fim, (iv) uma proposta alternativa para a otimização do método normalizado, com foco no aumento da frequência analítica e redução de uso de reagentes químicos, em compatibilidade com os princípios da Química Analítica Verde (QAV), utilizando digestão ácida assistida por micro-ondas.

Sequencialmente, são apresentados os resultados experimentais obtidos: (i) na verificação de desempenho do método normalizado AOAC-NMKL, (ii) na aplicação da digestão assistida por micro-ondas nas amostras e (iii) a comparação entre as duas metodologias avaliadas quanto à metodologia de hidrólise e a QAV.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Implementar o método normalizado AOAC-NMKL para quantificação de 4-hidroxiprolina em produtos cárneos por espectrofotometria UV-Vis, e propor adaptações a fim de aumentar a frequência analítica e reduzir a quantidade de resíduos químicos, seguindo os princípios da Química Analítica Verde (QAV).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a verificação de desempenho do método AOAC-NMKL, de acordo com o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), em termos de repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade e exatidão, e aplicá-lo em amostras de rotina de produtos cárneos provenientes de estabelecimentos inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF);

Adaptar o método de preparo de amostras para quantificação de 4-hidroxiprolina em produtos cárneos utilizando um sistema de digestão assistida por micro-ondas (DAM) para hidrólise ácida, visando redução do consumo de reagentes químicos e aumento da frequência analítica, em concordância com os princípios da Química Analítica Verde (QAV) e comparando a performance do método normalizado AOAC-NMKL com o método proposto;

Aplicar o novo método em amostras de produtos cárneos provenientes de estabelecimentos inspecionados pelos Serviços de Inspeção Federal e Estadual (SIF e SIE, respectivamente);

Avaliar os resultados obtidos em relação à conformidade das amostras processadas de acordo com os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQs) dos produtos analisados.

### 3 COLÁGENO: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE

A proteína mais abundante no mundo animal é o colágeno, contabilizando cerca de um terço de toda a massa proteica dos animais vertebrados (Gahlawat; Nanda; Shreiber, 2024; Sun, 2021). O colágeno é um biopolímero pertencente a uma superfamília de proteínas fibrosas que desempenham papel estrutural presentes na matriz extracelular de animais vertebrados e invertebrados. É comumente encontrado em tecidos como pele e tendões e ossos, sendo objeto de investigação científica há pelo menos um século (Kucharz, 1992; Oliveira et al., 2021).

A estrutura do colágeno foi proposta inicialmente por Ramachandran e Kartha (1955) e adaptada por Rich e Crick (1955). Ambos os estudos concluíram que o colágeno possui uma estrutura com três cadeias torcidas em uma espiral. Até o início dos anos 70, acreditava-se que existia somente um tipo de colágeno, o qual era estudado principalmente a partir de ossos e pele. O estudo de Miller e Matukas (1969) em cartilagens de galinhas, porém, demonstrou que essa matriz continha dois tipos diferentes de colágeno, apresentando diferentes cadeias-alfa. Com isso, diversos estudos começaram a ser desenvolvidos para a identificação dos tipos de colágeno existentes e suas estruturas.

Até o momento, 29 moléculas de colágeno foram identificadas, as quais são numeradas a partir do sistema de numeração romano e listadas à medida em que são estudadas. Essas moléculas são classificadas em categorias distintas de acordo com suas funções, disposição molecular e estruturas (Ding et al., 2024; Gahlawat; Nanda; Shreiber, 2024; Reese-Petersen et al., 2021; Salgado, 2014):

- I. Colágenos fibrilares – Tipos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII;
- II. Colágeno da lâmina basal – Tipo IV;
- III. Colágenos com triplas hélices interrompidas associados à colágenos fibrilares (FACIT) – Tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXVI, XXII;
- IV. Colágenos formadores de redes – Tipos VIII e X;
- V. Colágeno formador de fibrila de ancoragem – Tipo VII;
- VI. Colágenos formadores de microfibrilas – Tipos VI, XXVIII e XXIX;
- VII. Colágenos transmembranares – Tipos XIII, XVII, XXIII, XXV;
- VIII. Colágenos multiplexina (formadores de endostatina) – Tipos XVIII e XV.

Apesar da alta variedade molecular dessa proteína, o colágeno do tipo I é o mais amplamente estudado, especialmente devido às suas propriedades mecânicas de formação de fibras, as quais fornecem estabilidade mecânica e dureza aos tecidos conjuntivos (Ghanaeani; Soheilifard, 2018; Siadat; Ruberti, 2023).

O tecido conjuntivo é composto, de maneira geral, por três camadas: epimísio, a camada mais externa e que envolve os músculos; perimísio, a camada que envolve fibras musculares e o endomísio, a camada mais interna do tecido conjuntivo (Purslow, 2020). Essas camadas conferem ao tecido conjuntivo papel fundamental tanto no desenvolvimento quanto no crescimento do tecido muscular, tendo sua quantidade e distribuição variadas entre músculos com diferentes funções. Os tecidos conjuntivos são encontrados em cartilagens, tendões, ligamentos, pele, tecido adiposo, ossos, entre outros, e são compostos por uma mistura de polissacarídeos e proteínas estruturais, sendo as principais a elastina e o colágeno (Astruc, 2014; Lepetit, 2008; Purslow, 2020; Tang et al., 2022).

A elastina confere elasticidade, flexibilidade e sustentação a vasos sanguíneos e órgãos (Kamaruzaman; Yusop, 2021). O principal aminoácido presente nessa proteína é a glicina, representando aproximadamente um terço de sua composição. O restante dos resíduos da elastina é hidrofóbico, constituído especialmente por alanina, valina e prolina, conferindo a elasticidade como a principal característica de suas fibras (Wen; Mithieux; Weiss, 2020).

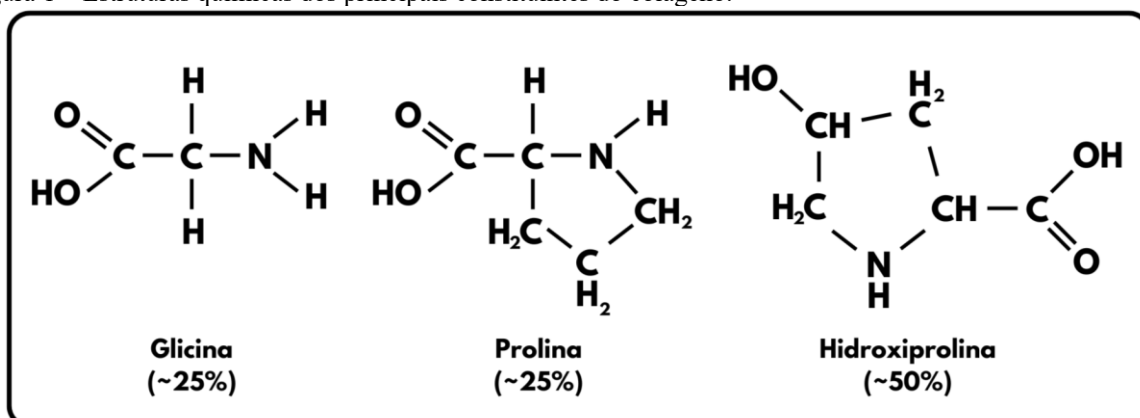
O colágeno, assim como a elastina, possui a glicina como constituinte de um terço de sua molécula. A diferenciação entre elas ocorre nos resíduos restantes do colágeno, especialmente prolina e 4-hidroxiprolina, dois aminoácidos específicos do colágeno, além de lisina e hidroxilisina, as quais o conferem características menos hidrofóbicas em comparação à elastina (Ferraro; Anton; Sante-Lhoutellier, 2016).

A família colagênica é composta por um grupo de macromoléculas que, embora compartilhem similaridade estrutural, apresentam particularidades químicas distintas que conferem especificidade funcional a cada tipo de colágeno. Todas as moléculas identificadas até o momento compartilham algumas características estruturais fundamentais, entre as quais se destaca a presença de um ou mais domínios formados por três cadeias polipeptídicas (denominadas cadeias- $\alpha$ ), torcidas na mesma direção e organizadas de forma paralela, assemelhando-se a uma corda. Essa conformação resulta na formação de uma estrutura em tripla-hélice, estabilizada por ligações de hidrogênio e

interações hidrofóbicas entre as cadeias (Gahlawat; Nanda; Shreiber, 2024; Kucharz, 1992).

Outra característica comum às moléculas da família colagênica é a presença de repetições do resíduo de glicina (Gly) na sequência padrão Gly-X-Y, em que o aminoácido na posição X é, com frequência, a prolina (Pro), e na posição Y, a 4-hidroxi prolina (L-hidroxi prolina, Hyp) (Bou-Gharios; Abraham; de Crombrughe, 2019; Campos et al., 2023). As estruturas químicas dos principais constituintes da molécula de colágeno são apresentadas na Figura 1. Cada uma dessas moléculas é composta por uma sequência de cerca de 1000 aminoácidos (Kucharz, 1992; Wang et al., 2025). Neste trabalho, a 4-hidroxi prolina será referida como hidroxi prolina (Hyp), para fins de padronização.

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais constituintes do colágeno.

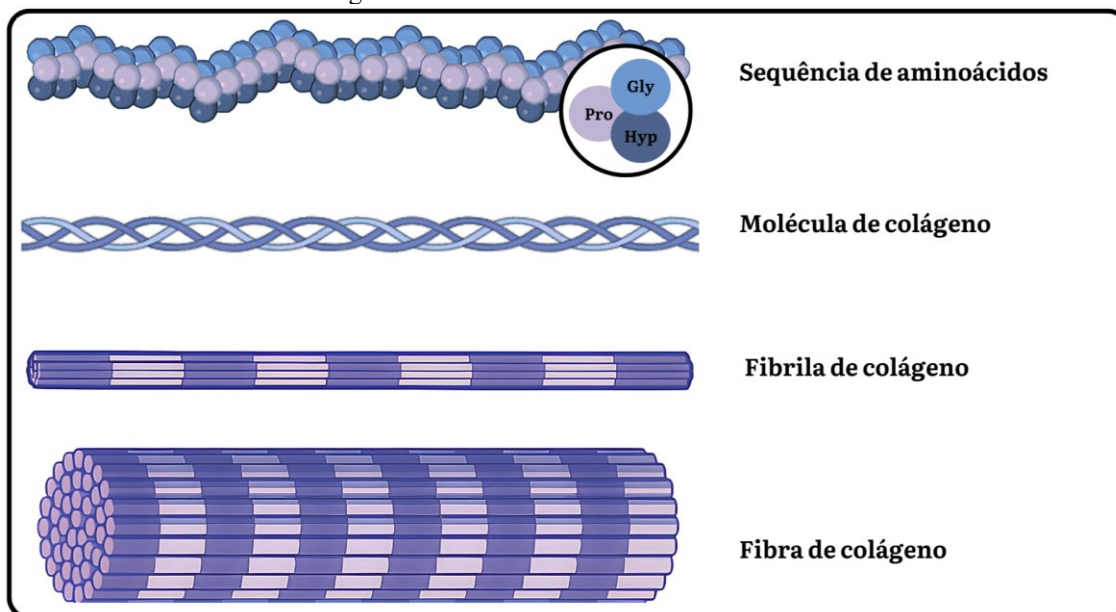


Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Alam et al. (2022).

A biossíntese do colágeno é um processo extremamente complexo e que envolve diversas etapas. Inicialmente, ocorrem a transcrição e tradução do gene do colágeno na célula, a fim da formação do pró-colágeno (forma precursora da molécula) (Kaku; Yamauchi, 2014). Essa etapa é seguida por uma sequência de reações de hidroxilação e glicosilação dos resíduos de aminoácidos constituintes do pró-colágeno (Wang et al., 2025). A partir da sua formação, ocorre a associação de três cadeias de pró-colágeno, resultando em uma tripla-hélice helicoidal (Selvaraj et al., 2024). Nessa etapa é fundamental que a hidroxilação dos resíduos de prolina tenham ocorrido com eficiência, uma vez que as moléculas de hidroxi prolina são essenciais para a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas livres de água, o que auxilia na rigidez e resistência da tripla hélice a tensões mecânicas e temperatura corporal (Gahlawat; Nanda; Shreiber, 2024).

O pró-colágeno é então secretado para a matriz extracelular e clivado, formando o tropocolágeno (Tang et al., 2022). É nessa configuração que as moléculas se alinham de maneira organizada e formam fibrilas de colágeno, as quais são estabilizadas por ligações covalentes e se organizam em feixes paralelos que são unidos por forças de interação intermoleculares, resultando, finalmente, na fibra de colágeno (Sionkowska, 2021). Um breve esquema da formação da fibra de colágeno é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura da fibra de colágeno.



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Alam et al. (2022).

A proteína colagênica pode ser apresentada de diferentes maneiras, incluindo suas formas de peptídeos e gelatina. A gelatina é um produto da desnaturação parcial do colágeno por hidrólise controlada ácida (gelatina tipo A) ou alcalina (gelatina tipo B) (Iahnke et al., 2019; Vargas et al., 2022). A conversão de colágeno em gelatina ocorre quando o colágeno solubilizado é submetido a tratamentos térmicos que desestabilizam as triplas-hélices e as convertem em outra estrutura (espiral), resultando na gelatina solúvel. A gelatina possui propriedades gelificantes termo reversíveis, onde o processo de gelificação ocorre quando ela sofre redução de temperatura em soluções abaixo de 30 °C, e o derretimento desses géis ocorre com o aumento da temperatura (Gomez-Guillen et al., 2011). Na indústria de alimentos, a gelatina é utilizada como estabilizante e intensificador de consistência em espumas, géis e emulsões, além de suas propriedades que favorecem alterações de textura, sabor e cor (Irastorza et al., 2021).

Já os peptídeos de colágeno, também chamado de colágeno hidrolisado, são produtos da hidrólise do colágeno nativo ou da gelatina, resultando em fragmentos

proteicos de baixo peso molecular que são altamente solúveis e possuem propriedades emulsificantes (Hajj et al., 2024; Tawalbeh et al., 2025). Na indústria de alimentos, possuem diversas aplicações, como substituintes em produtos cárneos com baixo teor de gordura, emulsificantes e antioxidantes, clarificante para bebidas, prolongadores de vida de prateleira de emulsões, entre outros (Tang et al., 2022).

### 3.1. APLICAÇÕES DO COLÁGENO

O colágeno do tipo I é o mais abundante nos mamíferos e amplamente estudado devido às suas propriedades de formação de fibrilas e aplicações biomédicas. Ele está presente na composição da derme, tendões, ossos, globo ocular, dentre outros, e pode ser extraído de diversas fontes, incluindo animais marinhos (pele, espinhas, escamas e bexigas natatórias de peixes), mamíferos (tendão de cavalos e da cauda de ratos e cangurus, pele de ovelhas, bovinos e suínos), pássaros (pés de galinhas e patos), anfíbios (ossos e pele de sapos), dentre outros (Alam et al., 2022; Sionkowska, 2021; Tong et al., 2025). A importância do colágeno na saúde e bem-estar é amplamente reconhecida, sendo uma das principais proteínas utilizadas em suplementos cosméticos e alimentares (Alam et al., 2022).

Na indústria farmacêutica e cosmética, o colágeno é muito utilizado por conta de sua solubilidade, propriedades emulsificantes, espumantes (Salim et al., 2024) e de cicatrização de feridas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Sowbhagya et al., 2024), baixa alergenicidade (Hajj et al., 2024), dentre outras características que essa proteína possui. Sua utilização nessas áreas está bastante presente nos campos de preenchimentos faciais, hidratação, mecanismos antienvhecimento, antioxidantes e anti-inflamatórios, bem como na recuperação de queimaduras, acidentes e traumas através de seu uso como pele artificial (Irastorza et al., 2021).

Sua aplicabilidade também é vasta na indústria de alimentos, onde pode ser utilizado como aditivo alimentar devido às suas propriedades funcionais, tais como: capacidade de absorção de água, emulsificante, estabilizante, espessante e de formação de géis (Ahmad et al., 2024; Alexandretti et al., 2019). Em produtos lácteos, por exemplo, o colágeno na forma de gelatina pode ser utilizado com a finalidade de melhorar a viscosidade, consistência e retenção de água do iogurte (Yin et al., 2021), além de estabilizar espumas na fabricação de sorvetes (Damodaran; Wang, 2017).

Em produtos de panificação e confeitaria, a gelatina é utilizada na melhora de estrutura e textura, bem como no aumento do tempo de conservação de pães (Ahmad et al., 2024) e textura de balas de goma. Além disso, tanto o colágeno quanto a gelatina são muito utilizados como invólucro em produtos cárneos e queijos, auxiliando na preservação desses produtos através da formação de uma barreira contra oxigênio e vapores (Tang et al., 2022).

### 3.2. COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS

O colágeno extraído de fontes animais é amplamente utilizado na indústria de produtos cárneos devido às suas propriedades emulsificantes, gelificantes e estabilizantes, que contribuem para a textura, consistência e estabilidade dos alimentos. Nessas formulações, pode ser incorporado de diferentes maneiras e a partir de diversas matérias-primas, conforme a finalidade tecnológica e o tipo de produto elaborado.

O colágeno de animais de abate pode ser utilizado na fabricação de invólucros de salsichas (Suurs et al., 2023a, 2023b), a fim de bloquear o contato direto do oxigênio com o produto (Tang et al., 2022). Outras aplicações incluem o uso de colágeno de fontes marinhas como aditivo alimentar, melhorando as propriedades de retenção de água, cor e textura em salsichas (Jridi et al., 2015). O colágeno extraído de suínos pode agir como substituinte parcial de gordura em salsichas (Hjelm et al., 2019) e hambúrgueres (utilizando gelatina extraída de pele bovina), diminuindo perda de cozimento e aumentando a vida de prateleira dos produtos (Gao et al., 2022). Já a fibra de colágeno bovino e o colágeno bovino em pó podem ser utilizados como uma alternativa de baixo custo para o aumento da capacidade de retenção de água e rendimento do cozimento de hambúrgueres de carnes de frango e porco (Alexandretti et al., 2019).

Apesar de atuar com considerável relevância em relação à melhoria de desempenho e conservação de produtos cárneos, a presença da proteína colagênica em alguns produtos também pode indicar ocorrência de adulteração. Carnes com quantidades elevadas de tecido conjuntivo e conseqüentemente com alto teor colagênico são consideradas de baixa qualidade, por conta do seu inferior valor de mercado. A qualidade da carne desses animais está intrinsecamente relacionada à quantidade e composição do tecido conjuntivo que essa possui, afetando principalmente fatores como retenção de água e textura (Astruc, 2014).

Dessa forma, o teor de colágeno atua como indicador da qualidade da matéria-prima utilizada na produção de carnes e produtos cárneos (Anzani et al., 2020; Messia et al., 2008). Não é incomum a prática de substituição de uma espécie por outra, visando maior lucro e menores despesas. Além disso, o colágeno pode ser utilizado como substituinte de tecidos em embutidos emulsionados com a finalidade de aumentar o seu teor proteico, prática considerada adulteração, devido ao menor valor nutricional do colágeno (Anzani et al., 2020; Ballin, 2010).

Considerando esses fatores, a determinação do teor colagênico em carnes e produtos cárneos apresenta grande importância. Para o controle de adulterações desse cunho, a legislação brasileira tem estabelecido limites máximos de colágeno permitidos na elaboração de produtos cárneos.

#### 4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Alguns produtos cárneos, como os embutidos cozidos, podem ser elaborados a partir de carne mecanicamente separada, aparas e retalhos provenientes do processo de desossa. Esses produtos apresentam um elevado teor de proteínas pertencentes ao tecido conjuntivo colagenoso, de baixo valor nutricional, por serem pobres em lisina, triptofano e outros aminoácidos sulfurados (Messia et al., 2008).

A legislação brasileira estabelece limites regulatórios (LRs) para o uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia na elaboração de produtos cárneos, visando a garantia da qualidade alimentar e segurança da população consumidora desses produtos. O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), órgão responsável pela fiscalização e implementação de Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQs) de produtos de origem animal, estabelece LRs máximos de colágeno em determinados produtos (Quadro 1).

Quadro 1 – Definição e limites regulatórios de produtos cárneos com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estabelecido para análise de colágeno.

<b>Produto</b>	<b>Definição</b>	<b>Limite regulatório para colágeno</b>
Apresentado	Produto cárneo originado de recortes e cortes de músculos suínos transformados em massa, com adição de condimentos e outros ingredientes e submetido a processamento térmico (Brasil, 2022a).	25%
Fiambre	Produto cárneo obtido a partir da carne de uma ou mais espécies animais, contendo ou não miúdos e outras partes comestíveis, com adição de condimentos e outros ingredientes e submetido a processamento térmico (Brasil, 2022b).	25%

<b>Produto</b>	<b>Definição</b>	<b>Limite regulatório para colágeno</b>
		Aves/Coelhos: 8%
		Bovinos: 20%
Hambúrguer	Produto cárneo originado a partir da carne moída de animais de açougue, possuindo opcionalmente tecido adiposo e outros ingredientes, apresentado em forma oval ou de disco e comercializado cru, cozido, congelado ou resfriado (Brasil, 2022c).	Aves/Coelhos (sem adição de proteínas não-cárneas): 10%
		Demais espécies (sem adição de proteínas não-cárneas): 25%
Presunto	Presunto cozido, presunto cozido superior e presunto cozido tenro são produtos cárneos fabricados a partir de cortes íntegros de pernil suíno, podendo ser curados, cozidos, opcionalmente desossados e defumados, com adição de ingredientes e aditivos. O presunto cozido de aves é obtido estritamente a partir dos membros posteriores de aves desossadas, moídos ou não e com adição de outros ingredientes (Brasil, 2023).	Suínos: 25%
		Aves: 10%

Fonte: Elaborada pela autora. Dados retirados de: Brasil (2022b, 2022a, 2022c, 2023).

Em todos os produtos cárneos com LRs de colágeno estabelecidos pelos RTIQs deve ser quantificado o teor de tecido conjuntivo colagenoso (TCC) com base no teor total de proteína dos produtos. Essa quantificação é realizada através da determinação da hidroxiprolina (Hyp), um aminoácido que se apresenta quase que exclusivamente no colágeno, sendo, portanto, considerado o principal marcador para a determinação dessa proteína em tecidos e alimentos. Um resultado de análise de colágeno é obtido multiplicando-se a concentração de Hyp por oito, considerando que o tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de Hyp, se o fator de conversão nitrogênio–proteína for 6,25 (Messia et al., 2008; Oliveira et al., 2021). A seguir, são apresentadas diferentes abordagens para a determinação de hidroxiprolina em produtos cárneos.

## 5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO

A quantificação de Hyp como marcador de colágeno em produtos cárneos é um procedimento consolidado na literatura, sendo realizada comumente por meio do método normalizado da AOAC *International* nº 990.26, desenvolvido em estudo colaborativo conduzido pelo *Nordic-Baltic Committee on Food Analysis* (NMKL) com o método NMKL 127, que emprega hidrólise ácida seguida de complexação e determinação por espectrofotometria de absorção molecular na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

## 5.1. MÉTODO AOAC-NMKL

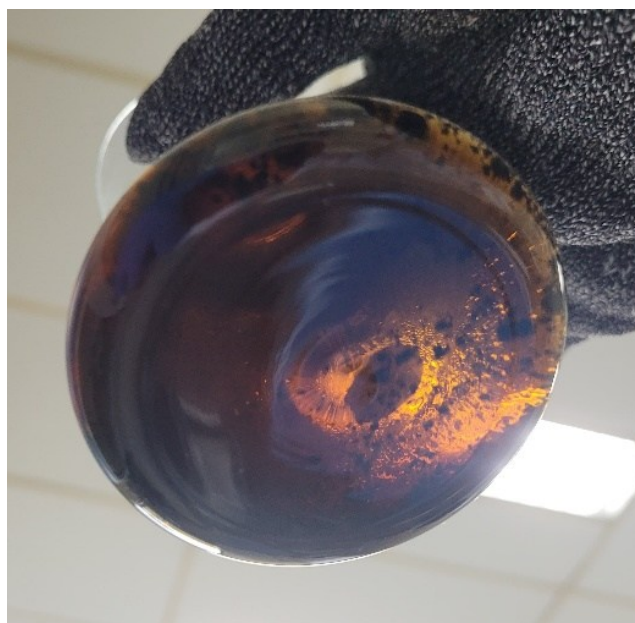
No procedimento de preparo das amostras do método normalizado AOAC-NMKL as amostras são submetidas à hidrólise em estufa com ácido sulfúrico 3,5 mol L<sup>-1</sup> por 16 h. Decorrido esse tempo, o hidrolisado resultante passa por uma série de diluições para a obtenção do extrato de leitura, o qual é oxidado pela ação de uma solução tamponada à base de cloramina-T e posteriormente complexada com uma solução reagente de cor (4-dimetilaminobenzaldeído, DMAB). Em seguida, os tubos são submetidos a um banho-maria para a formação do cromóforo que, por fim, tem a absorvância medida em espectrofotômetro UV-Vis a  $558 \pm 2$  nm.

### 5.1.1. Hidrólise e obtenção do extrato de leitura

A hidrólise ácida é estabelecida a fim de que ocorra a protonação dos átomos que compõe as ligações peptídicas da proteína colagênica. Após a protonação, o carbono da ligação peptídica sofre um ataque nucleofílico da água, resultando na clivagem da ligação e liberação de aminoácidos constituintes da proteína (Nelson; Cox, 2009). Esse processo é repetido em todas as ligações peptídicas do colágeno, até que a molécula seja totalmente quebrada e convertida em seus aminoácidos livres.

A utilização do ácido sulfúrico para a hidrólise da molécula de colágeno é interessante por conta de sua viscosidade, a qual potencializa a eficiência térmica da hidrólise que, por sua vez, acelera o processo rompimento das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas do colágeno, tornando-o solúvel (Yan et al., 2022). O tempo prolongado de hidrólise (16 h), garante que a maior parte das ligações peptídicas sejam quebradas, degradando totalmente o colágeno em seus aminoácidos livres, especialmente a Hyp, que é particularmente resistente à degradação total do colágeno, diferente dos outros aminoácidos constituintes dessa proteína. Por essa razão, ela é tida como marcador químico do colágeno. A solução resultante da hidrólise é extremamente ácida (pH  $\approx$  0-1) e turva (Figura 3) e contém resíduos orgânicos e partículas suspensas, sendo necessárias subsequentes filtração e diluição do extrato.

Figura 3 – Solução resultante da hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $3,5 \text{ mol L}^{-1}$  por 16 h para análise de colágeno em produtos cárneos.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.1.2. Complexação

Após a obtenção do extrato, é necessária sua neutralização, a fim de que as reações com o reagente DMAB ocorram de forma eficiente. Essas reações dependem de pH levemente ácido, aproximadamente 6,0, o qual é obtido com a oxidação do extrato utilizando uma solução de cloramina-T, também chamada de reagente oxidante. Essa solução é preparada a partir da diluição da cloramina-T em um tampão preparado à base de acetato de sódio, ácido cítrico, hidróxido de sódio e propanol. É muito importante que o pH dessa solução seja controlado, uma vez que em pH mais ácido a cloramina-T é instável e em pH básico ela não reage apropriadamente com a hidroxiprolina (Stegemann; Stalder, 1967).

A solução de cloramina-T possui a função de oxidar o grupo alcoólico da Hyp, e após ser adicionada ao extrato obtido da hidrólise deve ficar em repouso por 20 minutos. Caso esse tempo não seja atendido, a formação do complexo final pode não ocorrer adequadamente ou, ainda, ser degradado (Reddy; Enwemeka, 1996). A cloramina-T oxida a Hyp e transforma o seu grupo hidroxila em um aldeído, possuindo como produto final um pirrol (Hofman et al., 2011).

Já o DMAB, também conhecido por reagente de Ehrlich, é preparado em meio ácido, usualmente diluindo ácido perclórico em isopropanol. É esse composto quem reage com o pirrol derivado da oxidação da hidroxiprolina, formando um complexo colorido,

geralmente rosa ou vermelho, que absorve luz visível (Cissell et al., 2017). Esse complexo é então quantificado por espectrofotometria a 558 nm e sua intensidade é proporcional à concentração de hidroxiprolina presente na amostra, sendo posteriormente convertida em colágeno. A principal desvantagem do método AOAC-NMKL refere-se ao tempo demasiadamente prolongado para a etapa de hidrólise. Por esse fator, algumas técnicas alternativas têm sido desenvolvidas para a quantificação de Hyp em carnes e produtos cárneos, visando menor tempo requerido para o preparo de amostras.

## 5.2. TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS

Devido ao longo tempo de análise demandado pelo método oficial AOAC-NMKL, diversas modificações nas etapas de preparo de amostra e quantificação de hidroxiprolina têm sido propostas. Abordagens analíticas alternativas para determinação de colágeno em produtos de origem animal, incluindo informações de matriz, quantidade de amostra, tipo de hidrólise, métodos de preparo, métodos analíticos, teor de Hyp e/ou colágeno e parâmetros de desempenho são apresentadas com detalhes na Tabela 1.

Tabela 1 – Métodos analíticos para determinação de colágeno em carnes e produtos cárneos, incluindo informações de matriz, quantidade de amostra, tipo de hidrólise, métodos de preparo, métodos analíticos, teor de hidroxiprolina e/ou colágeno e parâmetros de desempenho.

<b>Matriz (quantidade de amostra)</b>	<b>Hidrólise</b>	<b>Método de preparo</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Hidroxiprolina (g 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Colágeno (g 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Parâmetros de desempenho</b>	<b>Referência</b>
Mortadela Salame (0,25 g)	Digestão ácida (8 mL de HCl 6 mol L <sup>-1</sup> ) assistida por micro-ondas, por 6 min.	Filtração do hidrolisado, seguido de evaporação e subsequente redissolução do extrato seco em HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , diluição e nova filtração.	<b>HPAEC-PAD + Sistema Dionex</b>  <b>Coluna cromatográfica:</b> Aminopac PA10 (250 x 2 mm) <b>Fase móvel:</b> H <sub>2</sub> O + Hidróxido de sódio (250 mmol L <sup>-1</sup> ) + Acetato de sódio (1 mol L <sup>-1</sup> )	Mortadela: 0,26  Salame: 0,23	<b>Base úmida</b>  Mortadela: 2,07  Salame: 1,87	<b>Taxa de recuperação:</b> 97 – 104%	(Messia et al., 2008)
Músculo ovino (3,00 g)	Hidrólise ácida, com 2 mL de HCl 6 mol L <sup>-1</sup> sob fluxo de nitrogênio a 110°C <i>overnight</i> .	Resfriamento seguido de centrifugação (14.000 rpm, 1 min). Liofilização de 100 µL do extrato obtido e posterior reconstituição em 1 mL de ácido fórmico (0,1%). Adição de 50 µL de padrão interno e 50 µL de ácido fórmico (0,1%)	<b>LC-MS/MS</b>  <b>Coluna cromatográfica:</b> Zorbax SB-Aq <b>Fase móvel A:</b> Ácido fórmico (0,1%) <b>Fase móvel B:</b> Ácido fórmico (0,1%) em 90% de ACN.	-	<b>Base úmida (75% umidade)</b>  0,4 – 0,6	<b>LD:</b> 4,88 nmol L <sup>-1</sup> <b>Taxa de recuperação:</b> 90 – 108%	(Colgrave; Allingham; Jones, 2008)
Chouriço mexicano Salsicha tipo Frankfurter Presunto (4 g)	Método AOAC-NMKL (30 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7 mol L <sup>-1</sup> em estufa por 16 h a 105 °C)	Ajuste de pH do hidrolisado ácido (pós-filtração) para 10,0 com NaOH 4 mol L <sup>-1</sup> . Adição de 0,5 mL dessa solução + 0,5 mL de tetraborato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Diluição da amostra e ajuste de pH para 9,5, seguida de nova filtração e derivatização com fluorescamina. Evaporação por concentrador à vácuo.	<b>MEKC-DAD</b>  <b>Capilar de sílica:</b> 50 mm x 50 cm <b>Injeção:</b> 0,5 psi (10 s) <b>Separação:</b> 12 kV, 33 °C <b>Tampão:</b> tetraborato de sódio (pH 9,3) + SDS (100 mmol L <sup>-1</sup> ) <b>Comprimento de onda:</b> 214 nm	Chouriço mexicano: 0,18  Salsicha tipo Frankfurter: 0,15  Presunto: 0,10	Chouriço mexicano: 11,17  Salsicha tipo Frankfurter: 12,88  Presunto: 7,16	<b>Hyp:</b> <b>LQ:</b> 0,07 g 100 g <sup>-1</sup>	(Mazorra-Manzano et al., 2012)

Matriz (quantidade de amostra)	Hidrólise	Método de preparo	Método analítico	Hidroxirolina (g 100 g <sup>-1</sup> )	Colágeno (g 100 g <sup>-1</sup> )	Parâmetros de desempenho	Referência
Salsicha tipo Viena (-)	Câmara de hidrólise + solução solubilizante (dodecilsulfato de sódio, NaOH e H <sub>2</sub> O) durante 15 min a 0,6 bar e 115 °C.	Passagem do hidrolisado a uma câmara de detecção, seguida de oxidação pela cloramina-T e adição do reagente de cor. Solução resultante mantida na câmara por 20 min a 60 °C.	<b>Espectrofotometria UV-Vis</b>  <b>Comprimento de onda:</b> 560 nm	0,166 – 0,485	-	<b>LD:</b> 0,12 µg mL <sup>-1</sup>	(Belloni et al., 2012)
Fígado de suíno (0,01 – 0,02 g)	Autoclavagem por 40 min com 0,5 mL de NaOH (7 mol L <sup>-1</sup> ) a 120 °C.	Hidrolisado alcalino acidificado com 0,5 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup> . Diluição em balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura. Adição de 4,5 mL cloramina-T. Reação após adição do reagente de cor por 15 min a 65 °C.	<b>Espectrofotometria UV-Vis</b>  <b>Comprimento de onda:</b> -	-	(mg g <sup>-1</sup> de tecido) Fígado de suíno: 8,27  Salsicha de suíno: 13,76	<b>LD:</b> 0,03 µg mL <sup>-1</sup>  <b>LQ:</b> 0,11 µg mL <sup>-1</sup>  <b>Taxa de recuperação:</b> 95 – 100%	(Da Silva; Spinelli; Rodrigues, 2015)

#### HPLC-FLD

Carne de camelo (0,2 g)	Incubação a 110 °C por 24 h com 5 mL de HCl 6 mol L <sup>-1</sup> em estufa.	Diluição 1:100 do hidrolisado com 4 mL de AABA 2,5 mmol L <sup>-1</sup> e água ultrapura. Filtração de 2 mL do hidrolisado diluído com filtro de seringa PTFE (0,45 µm) em microtubo. Para derivatização, mistura de 10 µL do filtrado com 70 µL de tampão borato. Agitação imediata por 5 s. Derivatização da mistura com adição de 20 µL do reagente AccQ-Fluor <sup>TM</sup> e nova agitação.	<b>Coluna cromatográfica:</b> Waters AccQ fase reversa (3,9 x 150 mm, 4 µm, 60 Å) <b>Fase móvel A:</b> AccQ Tag <sup>TM</sup> Eluent A (1:10) <b>Fase móvel B:</b> ACN 100% <b>Fase móvel C:</b> H <sub>2</sub> O 100% <b>Comprimento de onda de excitação:</b> 250 nm <b>Comprimento de onda de detecção:</b> 395 nm	0,51 (< LD e LQ)	-	<b>LD:</b> 2,017 ng µL <sup>-1</sup>  <b>LQ:</b> 6,722 ng µL <sup>-1</sup>  <b>Taxa de recuperação:</b> 85 – 99%	(Yuswan et al., 2021)
-------------------------	--	--	--	------------------	---	---	-----------------------

Matriz (quantidade de amostra)	Hidrólise	Método de preparo	Método analítico	Hidroxirolina (g 100 g <sup>-1</sup> )	Colágeno (g 100 g <sup>-1</sup> )	Parâmetros de desempenho	Referência
Paio				Calabresa: 0,17 – 0,28	Calabresa: 1,34 – 2,27		
Calabresa		Diluição do hidrolisado em balão volumétrico de 10 mL água ultrapura.		Fiambre: 0,16	Fiambre: 1,25		
Salsicha tipo Brühwurst	Método AOAC-NMKL, com adaptações:	Limpeza do extrato: transferência de 200 µL do hidrolisado para microtubos de polipropileno de 2 mL contendo carbonato de estrôncio (105 mg). Adição de padrão interno e butilamina (100 mg L <sup>-1</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> , respectivamente, em volume total de 1 mL). Centrifugação a 14.100 g por 3 min. Sobrenadante submetido a análise por C.E.	<b>CD-EKC-DAD</b> <b>Capilar de sílica:</b> 56 cm x 75 µm D.I. x 375 µm D.E. <b>Injeção:</b> 50 mbar (15 s) <b>Separação:</b> 30 kV, 12,5 °C <b>Tampão:</b> Histidina (25 mmol L <sup>-1</sup> ), butilamina (180 mmol L <sup>-1</sup> , pka 10,8) e β-ciclodextrina (10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 11,4). <b>Comprimento de onda:</b> 220 nm	Mortadela tipo Bologna: 0,13 – 0,29	Mortadela tipo Bologna: 1,06 – 2,33	<b>Hyp:</b> <b>LD:</b> 1,48 mg L <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 4,70 mg L <sup>-1</sup>	
Salsicha tipo Frankfurter	Hidrólise ácida (7,5 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup> ) em estufa a 105 °C por 16 h.			Paio: 0,18	Paio: 1,43	<b>Colágeno:</b> <b>LD:</b> 0,06 g 100 g <sup>-1</sup> <b>LQ:</b> 0,16 g 100 g <sup>-1</sup>	(Alves et al., 2023)
Mortadela tipo Bologna				Patê: 0,05	Patê: 0,43	<b>Taxa de recuperação:</b> 88 – 97%	
Patê				Salsicha tipo Brühwurst: 0,36	Salsicha tipo Brühwurst: 2,87		
Fiambre (1,00 g)				Salsicha tipo Frankfurter: 0,41	Salsicha tipo Frankfurter: 3,31		

AABA: Ácido α-aminobutírico. ACN: Acetonitrila. AOAC-NMKL: Método normalizado da *Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International e Nordic-Baltic Committee on Food Analysis* (NMKL). CD-EKC-DAD: Cromatografia eletrocínética assistida por ciclodextrina e detecção de arranjo de diodos. C.E.: Eletroforese capilar. D.E.: Diâmetro externo. D.I.: Diâmetro interno. HPAEC-PAD: Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho e detecção amperométrica pulsada. HPLC-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Hyp: Hidroxirolina. LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. LD: Limite de detecção. LQ: Limite de quantificação. MEKC-DAD: Cromatografia eletrocínética micelar com detecção de arranjo de diodos. PTFE: Politetrafluoretileno. SDS: Dodecil sulfato de sódio. UV-Vis: Ultravioleta visível. - : Parâmetro não informado.

Apesar da variedade de métodos de preparo e técnicas analíticas de quantificação do analito em amostras de origem animal, a maioria dos estudos abordam etapas em comum, como a hidrólise para obtenção da Hyp. Para a obtenção do aminoácido livre de hidroxiprolina, alguns estudos utilizaram HCl 6 mol L<sup>-1</sup> na hidrólise, com essa etapa sendo conduzida de diferentes maneiras, sob fluxos de nitrogênio a 110 °C *overnight* (Colgrave; Allingham; Jones, 2008), digestão assistida por micro-ondas a 155 °C por 6 min (Messia et al., 2008) e incubação em estufa a 110 °C por 24 h (Yuswan et al., 2021). Já Belloni et al. (2012) e Da Silva; Spinelli e Rodrigues (2015) realizaram hidrólise alcalina com NaOH, e Alves et al. (2023) e Mazorra-Manzano et al. (2012) conduziram a hidrólise de acordo com o método oficial AOAC-NMKL, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup> com modificações nas etapas seguintes.

Posteriormente à hidrólise, a maioria dos estudos procederam etapas de diluição, ou ajuste de pH seguido de diluição, dos hidrolisados, exceto Belloni et al. (2012), o qual conduziu o hidrolisado diretamente para uma câmara de detecção feita em laboratório, Colgrave; Allingham e Jones (2008), que liofilizaram o extrato obtido e o reconstituíram em ácido fórmico, seguindo com quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) e Messia et al. (2008), que procederam a filtração do hidrolisado, seguida de evaporação e subsequente redissolução do extrato seco em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, diluição e nova filtração, com quantificação por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho e detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

Para os demais estudos, as etapas de diluição e filtração dos hidrolisados e de quantificação de hidroxiprolina tiveram suas particularidades. Yuswan et al. (2021) prosseguiu com adição de reagentes de derivatização e tampão borato ao filtrado e subsequente quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). Já Da Silva; Spinelli e Rodrigues (2015), após hidrólise alcalina por autoclavagem, acidificaram o hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup>, seguindo com diluição do extrato e reações de oxidação e complexação e subsequente quantificação realizadas de acordo com o método oficial, com pequenas modificações.

Dos estudos que seguiram a abertura de amostras com base na hidrólise tradicional implementada no método AOAC-NMKL, Alves et al. (2023) realizaram limpeza do hidrolisado diluído com carbonato de estrôncio e adição de padrão interno e butilamina para subsequente quantificação por cromatografia eletrocínica assistida por ciclodextrina e detecção de arranjo de diodos (CD-EKC-DAD). Já Mazorra-Manzano et al. (2012) procederam com ajuste de pH do hidrolisado filtrado e derivatização do extrato

com fluorescamina, seguida de evaporação em concentrador à vácuo. A quantificação foi realizada por cromatografia eletrocínica micelar com detecção de arranjo de diodos (MEKC-DAD).

Embora técnicas analíticas como as de separação (cromatografia líquida e eletroforese capilar) também estejam sendo utilizadas para a quantificação de colágeno em carnes e produtos cárneos, a espectrofotometria UV-Vis ainda é uma das técnicas analíticas mais amplamente utilizadas para a determinação quantitativa de proteínas, aminoácidos e outros compostos em solução, a qual ocorre através da medição da absorção de luz em comprimentos de onda específicos. Combinando precisão, velocidade e facilidade de uso, além de possuir baixos custos de aquisição e manutenção, ela é adequada para diversas aplicações (Abadi et al., 2012; Cerdà; Phansi; Ferreira, 2022). Por esse motivo, essa técnica tem sido amplamente utilizada na quantificação de macromoléculas, tais como o colágeno.

No entanto, o procedimento de hidrólise empregado no método oficial para quantificação de hidroxiprolina é uma etapa morosa, conforme constatado pelos estudos previamente apresentados. Ainda que existam propostas de simplificação desse protocolo, muitas delas envolvem múltiplas etapas e o uso de diversos reagentes, o que pode comprometer sua aplicabilidade em rotinas analíticas. Nesse contexto, torna-se viável a busca por estratégias de otimização do tempo de hidrólise, com a adoção de abordagens que empreguem menor quantidade de reagentes e que permitam a quantificação por espectrofotometria UV-Vis de forma mais eficiente e acessível.

### 5.3. HIDRÓLISE ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Apesar do método oficial AOAC-NMKL para a determinação de Hyp possuir baixo custo e fácil realização, ainda envolve etapas laboriosas, que demandam um tempo excessivo e geram elevada quantidade de resíduos químicos. À luz das tendências atuais que buscam métodos químico-analíticos mais verdes, que visam essencialmente reduzir o consumo de reagentes e o uso de substâncias tóxicas, existe potencial para explorar novos métodos de preparação que podem simplificar a aplicação do processo de determinação da Hyp em produtos cárneos.

Uma possível alternativa inclui o uso de digestão assistida por micro-ondas (DAM), abordagem que oferece diversas vantagens, entre elas a redução do consumo de volume de reagentes e de amostras, e miniaturização de técnicas. Além disso, esse sistema

é passível de executar a hidrólise mais rapidamente do que outros métodos presentes na literatura (Alves et al., 2023; Colgrave; Allingham; Jones, 2008; Da Silva; Spinelli; Rodrigues, 2015; Mazorra-Manzano et al., 2012; Yuswan et al., 2021).

A DAM garante a digestão completa e homogênea de amostras, fazendo uso de temperaturas elevadas. O uso da energia de radiação eletromagnética do micro-ondas pode ser empregado em análises de rações, plantas, proteínas e peptídeos, entre diversas outras aplicações (Messia et al., 2008; Wang et al., 2022; Weber, 2022). A funcionalidade desse sistema é obtida com o uso de rotores de reação robustos, os quais acomodam vasos de politetrafluoretileno (PTFE) selados, promovendo uma digestão precisa em cada vaso de reação, independentemente de sua posição no rotor. Sua maior vantagem se concentra na combinação de elevadas temperaturas em vasos altamente resistentes à pressão, garantindo a hidrólise de diversos tipos de matrizes em um curto tempo de reação (Weber, 2022).

A radiação de micro-ondas permite que as amostras absorvam a energia e a convertam em calor, gerando o aumento de temperatura no vaso de reação. Esse aquecimento ocorre a nível molecular, uma vez que as interações intermoleculares entre solvente e amostra resultam em colisões, causando uma liberação de energia térmica e aquecendo rapidamente o meio (Messia et al., 2008; Wang et al., 2022). A partir do rápido aumento de pressão e temperatura, a estrutura celular da amostra é alterada, permitindo uma melhor mistura entre o solvente e a matriz.

O uso de micro-ondas para promover a hidrólise pode ser vantajoso quando comparado a outros métodos tradicionais, como a hidrólise ácida em banho-maria ou estufa, por sua rapidez e eficiência. Além disso, por ser um sistema fechado, permite uma hidrólise mais controlada, com menor variação de temperatura e pressão, fazendo uso de menores volumes de ácidos. Por essas características, a extração assistida por micro-ondas é uma abordagem extremamente eficiente, pois, por meio de um sistema automatizado, é capaz de fornecer alto rendimento de extração em um reduzido período de tempo, além de baixo consumo de solventes (Mora; Toldrá, 2023; Moreda-Piñeiro et al., 2018).

Por sua versatilidade, a DAM pode ser utilizada para análises de diferentes tipos de matrizes orgânicas e inorgânicas. Bitencourt et al. (2023) analisaram nanotubos de carbono utilizando DAM para determinação de contaminantes e resíduos de catalisadores metálicos. Seu uso também pode ser empregado na hidrólise de queratina em líquidos iônicos (Li et al., 2021) e na determinação de metais pesados em cinzas volantes de

incineração de resíduos sólidos urbanos (Han et al., 2021), demonstrando uma grande flexibilidade de uso dessa ferramenta.

### **5.3.1. Uso e vantagens da digestão assistida por micro-ondas na análise de alimentos**

A indústria de alimentos também tem utilizado a versatilidade da digestão assistida por micro-ondas para diversas determinações em diferentes matrizes alimentícias. Weber (2022) realizou a determinação de diversos aminoácidos utilizando hidrólise ácida assistida por micro-ondas em amostras de alimentos em pó ricos em proteína (fórmula infantil, colágeno e suplementos) e rações para suínos e aves. Outros estudos determinaram aminoácidos por diferentes métodos analíticos utilizando a DAM para hidrólise em matrizes complexas como pólen apícola (Themelis et al., 2019), levedura enriquecida com selênio (Zhang; Yang; Mester, 2012), farinha de trigo (Kabaha et al., 2011) e folhas de amoreira (Wang et al., 2022).

O uso da DAM é também comumente empregado na determinação de minerais e contaminantes em uma grande variedade de matrizes. Muller et al. (2017) realizaram a determinação multielementar em amostras comerciais de mel e farinhas de mandioca, milho, batata e trigo. Matrizes como arroz branco e integral (Lee; Park; Lee, 2023), trigo (Cerveira et al., 2020) e leite integral, desnatado e orgânico (Lee et al., 2022) também foram digeridas por esse sistema para determinação multielementar. Min Lao et al. (2023) determinaram metais pesados através da digestão ácida de amostras de peixe de água doce, camarão, caranguejo e moluscos bivalves. Cerqueira da Silva et al. (2021) também utilizaram DAM para a análise de refrigerantes, sucos e bebidas energéticas à base de guaraná para determinar cafeína e catequina, além do perfil de minerais. Outros trabalhos empregaram o uso desse equipamento para determinação multielementar em suplementos esportivos (Pereira et al., 2019).

Além da determinação multielementar e de aminoácidos, o micro-ondas pode ser empregado na digestão (Mary Leema; Persia Jothy; Dharani, 2022) e hidrólise (Tong et al., 2021) de algas; hidrólise de celulose e produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica (Mikulski; Kłosowski, 2023); despolimerização alcalina da lignina (Shao et al., 2018); proteólise de farinha de chia (Urbizo-Reyes et al., 2019); extração proteica alcalina de grãos cervejeiros, borra de café e talos de couve (Barrios et al., 2022); hidrólise

alcalina para isolamento de celulose em palha de trigo (Liu et al., 2021); hidrólise ácida em leite para determinação de furosina (Wang et al., 2020); entre outros.

A principal vantagem da utilização da hidrólise assistida por micro-ondas se encontra na combinação de altas temperaturas e pressão, possibilitando, a partir da alta versatilidade de aplicação na digestão de variados tipos de matrizes, a sua utilização como ferramenta de adaptação da etapa de hidrólise ácida para a determinação de Hyp em carnes e produtos cárneos para subsequente quantificação por espectrofotometria UV-Vis.

O uso desse sistema apresenta-se como uma alternativa rápida e eficiente em relação às técnicas utilizadas atualmente para a análise desse analito nessas matrizes, além de inovadora, uma vez que há escassez de estudos na literatura que apresentem a abordagem de hidrólise de produtos cárneos pelo sistema de digestão por micro-ondas (Messia et al., 2008) e subsequente determinação por espectrofotometria UV-Vis, além do potencial de redução de uso de reagentes e resíduos químicos gerados, alinhando-se com os princípios da Química Analítica Verde.

## **6 QUÍMICA ANALÍTICA VERDE**

A Química Analítica Verde (QAV) é uma abordagem que busca minimizar ou eliminar o impacto ambiental da análise química, levando em consideração todo o ciclo de vida dos processos analíticos (Imam; Abdelrahman, 2023). Essa abordagem se baseia em uma série de princípios e diretrizes, que visam a sustentabilidade e a redução do consumo de recursos. Alguns dos princípios da QAV, conforme Pena-Pereira, Wojnowski e Tobiszewski (2020) são apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Princípios da Química Analítica Verde, de acordo com Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski (2020).



Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação do impacto ambiental de um método analítico é importante para entender seu desempenho em termos de sustentabilidade e eficiência energética. Sumariamente, a avaliação do caráter verde de um método deve procurar responder a algumas questões pertinentes, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Questões relacionadas ao impacto ambiental de um método analítico.

Área	Questões pertinentes
Consumo de energia	O método analítico requer quantidades significativas de energia para funcionar? A energia utilizada é proveniente de fontes renováveis ou não renováveis?
Uso de reagentes	O método utiliza reagentes químicos em grande quantidade ou perigosos para o meio ambiente? Há alternativas mais verdes disponíveis?
Produção de resíduos	O método produz quantidades significativas de resíduos? Esses resíduos são recicláveis ou requerem tratamento especial?
Eficiência	O método analítico é eficiente em termos de tempo, recursos e custos? Existem alternativas mais eficientes disponíveis?

Fonte: Adaptado de Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski (2020).

Não existe uma metodologia única para quantificar o caráter verde de um método analítico. Mesmo entre pesquisadores dedicados a essa área, não há consenso sobre como atribuir pesos e pontuações aos atributos dos princípios da Química Verde. Contudo, algumas ferramentas *online* gratuitas têm sido amplamente citadas na literatura recente (Cora Jofre et al., 2023), como o AGREE (Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski, 2020) e o AGREEprep (Wojnowski et al., 2022). Essas ferramentas produzem gráficos de atribuição de notas para cada um dos critérios avaliados, bem como uma nota global final em relação ao caráter verde do método analítico.

O AGREE é um *software* que calcula o caráter verde de métodos analíticos com base em pesos e notas atribuídos a diversos requisitos a serem observados, produzindo um *score* final quantitativo (Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski, 2020). Já o AGREEprep, apesar de operar de maneira muito semelhante, possui mais enfoque no estágio de preparação da amostra do que na própria análise instrumental (Wojnowski et al., 2022). Ambos os *softwares* geram resultados tendo como base uma escala de 0 a 1, sendo considerados mais próximos a 1 os métodos que estão mais diretamente associados à QAV e 0, os menos verdes.

A análise de colágeno em produtos cárneos pelo método oficial AOAC-NMKL combina abordagens típicas da química analítica clássica (hidrólise ácida) com análise instrumental (espectrofotometria UV-Vis). No entanto, considerando a QAV, esse método apresenta baixa conformidade com os princípios propostos, devido especialmente

ao uso de grande quantidade de volumes de ácidos concentrados e a demora em algumas etapas, especialmente a hidrólise, além do uso elevado de água para as etapas de diluição.

A partir disso, o trabalho proposto adaptou o preparo de amostra, testando alternativas mais modernas e alinhadas com a QAV, como a digestão de amostras assistida por micro-ondas. As modificações implementadas foram comparadas ao método normalizado quanto ao caráter verde do método analítico. Tanto o AGREE quanto o AGREEprep foram usados para comparar o protocolo adaptado com a metodologia oficial para verificar qual possui um caráter mais verde, segundo os princípios da QAV.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1. PADRÕES E REAGENTES

Todos os reagentes usados para a verificação de desempenho foram de grau analítico. A água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> Integral 10 Millipore (Molsheim, França). O ácido sulfúrico foi adquirido da Supelco (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A cloramina-T, o 4-dimetilaminobenzaldeído, o ácido cítrico monohidratado, o hidróxido de sódio P.A., o 1-propanol e o 2-propanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Os ácidos clorídrico e perclórico foram obtidos da Neon Lab (Rio de Janeiro, Brasil). O acetato de sódio anidro foi obtido da Fisher Scientific (Hampton, EUA). O padrão analítico de 4-hidroxiprolina (pureza de 100 ± 0,6%) utilizado foi da Supelco (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

### 7.2. AMOSTRAS

Para a verificação do método normalizado AOAC-NMKL três amostras de presunto (n = 1), hambúrguer (n = 1) e salsicha (n = 1) foram analisadas em sete vias por amostra. Para o estudo de aplicabilidade do método verificado foram analisadas dez amostras incluindo presunto (n = 4), apresuntado (n = 2), hambúrguer (n = 2), mortadela (n = 1) e salsicha (n = 1), sendo consideradas representativas para o conjunto de matrizes de produtos cárneos, levando em conta os produtos que possuem limites regulatórios estabelecidos pelo MAPA. Todas as amostras utilizadas para a verificação de desempenho foram provenientes de estabelecimentos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Para a proposta de abertura das amostras por meio de digestão assistida por micro-ondas (DAM) foi utilizada uma amostra de hambúrguer e um produto cárneo cozido distribuído originalmente para ensaio de proficiência RVEP 232070 do *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien* (DRRR – Alemanha), com valor designado de 0,095 ± 0,009 g Hyp 100 g<sup>-1</sup>. Para o estudo de aplicabilidade do método proposto, foram analisadas oito amostras de apresuntado (n = 2), hambúrguer (n = 5) e presunto (n = 1), sendo consideradas representativas para o conjunto de matrizes de produtos cárneos. As amostras utilizadas para a proposta de abertura em micro-ondas foram provenientes de estabelecimentos sob fiscalização dos Serviços de Inspeção Federal e Estadual (SIF e SIE, respectivamente).

Como a verificação de desempenho do método AOAC-NMKL e a proposta de abertura das amostras por meio de DAM foram conduzidas em momentos distintos, as amostras empregadas em cada ensaio não foram as mesmas.

### 7.3. VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO AOAC-NMKL

#### 7.3.1. Procedimento experimental

O procedimento experimental da etapa de verificação de desempenho foi conduzido de acordo com o método normalizado da AOAC *International* nº 990.26 (AOAC, 1993), desenvolvido em estudo colaborativo conduzido pelo *Nordic-Baltic Committee on Food Analysis* (NMKL) com o método NMKL 127, conforme descrito a seguir.

As amostras utilizadas foram preparadas utilizando todo o conteúdo presente na embalagem, incluindo molho, geleia, gordura e qualquer outro elemento. As amostras foram picadas em pequenos pedaços e homogeneizadas em um triturador Blixer™ (Robot Coupe, Paris, França). Após o preparo das amostras, foram pesados 4,00 g de amostra em balança analítica (Marte AY-220, Shimadzu, Quioto, Japão) diretamente em frascos *erlenmeyer*, e adicionados 30 mL de ácido sulfúrico 3,5 mol L<sup>-1</sup>. Os frascos foram tampados com rolha de vidro e colocados em estufa FREAS 625 (Thermo Scientific, Massachussets, EUA) à temperatura de 103 ± 2 °C por 16 ± 2 h, para etapa de hidrólise. Decorrido o tempo, o hidrolisado quente foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 500 mL e avolumado com água ultrapura. Parte dessa solução foi filtrada para um frasco *erlenmeyer* através de papel filtro quantitativo. Em seguida, foram diluídos 5,0 mL do extrato filtrado para um balão de 100 mL.

Para a complexação, foram pipetados 2,0 mL do extrato diluído em tubo de ensaio com tampa. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução oxidante (cloramina-T diluída em tampão pH 6,0) e os tubos foram agitados e deixados em repouso por 20 ± 2 min em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de repouso, adicionou-se 1,0 mL da solução reagente de cor (4-dimetilaminobenzaldeído diluído em ácido perclórico 70% e 2-propanol). Os tubos foram tampados, agitados em vórtex e colocados em banho-maria em temperatura de 60 ± 0,5 °C durante 15 min. Em seguida, os tubos foram resfriados sob água corrente por no mínimo 3 minutos e secos. Por fim, foi transferida uma alíquota desse extrato para uma cubeta de quartzo e a absorbância da solução obtida foi medida contra um branco analítico em espectrofotômetro de absorção molecular na região do

Ultravioleta-Visível (UV-Vis) com feixe duplo, modelo UV-1800 (Shimadzu, Quioto, Japão) a  $558 \pm 2$  nm.

O teor de hidroxiprolina foi calculado de acordo com a Equação 1, conforme o empregado no método normalizado AOAC-NMKL:

$$H (g \ 100 \ g^{-1}) = \frac{h * 2,5}{m * a}$$

(Equação 1)

Onde:  $H$  = teor de hidroxiprolina ( $g \ 100 \ g^{-1}$ );  $h$  = hidroxiprolina ( $\mu g \ 2 \ mL^{-1}$ ) de filtrado, previsto pela curva de calibração;  $m$  = massa da amostra (g);  $a$  = alíquota (mL) de filtrado levado para a diluição a 100 mL.

Para calcular o teor de colágeno ( $g \ 100 \ g^{-1}$ ), o resultado obtido de hidroxiprolina ( $\mu g \ 2 \ mL^{-1}$ ) na alíquota analisada foi multiplicado por 8. Nos RTIQs dos produtos cárneos com limites regulatórios estabelecidos pelo MAPA, o valor de colágeno deve ser calculado em relação ao teor de proteína total da amostra, seguindo a Equação 2:

$$\text{Teor de colágeno em relação à proteína total (g 100 g}^{-1}) = \frac{COL * 100}{\% \text{ de proteína bruta}}$$

(Equação 2)

Onde: COL = colágeno ( $g \ 100 \ g^{-1}$ ); % de proteína bruta = conteúdo de nitrogênio da amostra ( $g \ 100 \ g^{-1}$ ) x 6,25.

A análise de proteína foi conduzida seguindo o protocolo oficial do MAPA, a partir da norma AOAC *International* 992.15, empregando combustão da amostra seguida de redução a nitrogênio molecular, estimando-se a quantidade de proteína bruta utilizando um fator de conversão de 6,25 (AOAC, 1992).

### 7.3.2. Parâmetros avaliados

O método teve seu desempenho verificado pelos estudos de linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (taxa de recuperação e estudo intralaboratorial) e limite de quantificação, tendo como referência o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008, revisão 08) do Instituto

Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2020) e o método normalizado AOAC-NMKL (AOAC, 1993).

#### 7.3.2.1. Linearidade

Para a linearidade, inicialmente foi estabelecida a faixa de trabalho (0,6 a 6,0  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina  $2 \text{ mL}^{-1}$  em produtos cárneos), adicionando-se dois níveis de concentração além do compreendido pelo método normalizado, a fim de abranger os limites regulatórios definidos pela legislação brasileira e as características dos produtos cárneos brasileiros. Em seguida, a linearidade foi avaliada pela reprodutibilidade de curvas de calibração preparadas em solvente. Foram preparadas três curvas analíticas com material de referência certificado de hidroxiprolina, em seis níveis de concentração além do zero. As curvas foram preparadas em triplicata de concentração e em três dias distintos. As replicatas de cada concentração foram analisadas aleatoriamente. O critério de aceitabilidade para os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foi de  $R^2 \geq 0,99$ .

Antes da regressão linear, foi verificada a ausência de valores *outliers* a partir do teste de Grubbs ao nível de 5% de significância. A regressão linear simples foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados, plotando-se um gráfico no *software Microsoft Excel*, onde no eixo das abscissas foram plotados os valores de concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g}$   $2 \text{ mL}^{-1}$ ) e no eixo das ordenadas os valores de absorbância das respectivas leituras no espectrofotômetro. A homocedasticidade do sistema foi verificada graficamente para constatação da distribuição aleatória dos resíduos ao redor da média e a ausência de tendências sistemáticas.

#### 7.3.2.2. Precisão

##### 7.3.2.2.1. Repetibilidade

A precisão, em termos de repetibilidade, foi avaliada por meio da análise de três diferentes amostras de produtos cárneos submetidas a todo o processo analítico. As amostras foram escolhidas de forma a contemplar três níveis (baixo, médio e alto) de concentração de hidroxiprolina (0,5, 1,6 e 4,2  $\mu\text{g}$   $2 \text{ mL}^{-1}$ ) e analisadas em sete vias por nível. O critério de aceitabilidade para o método foi de  $CV \leq 5,3\%$ . A ausência de valores *outliers* foi verificada por meio de teste de Grubbs ao nível de 5% de significância.

### 7.3.2.2.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise de três amostras submetidas a todo o processo analítico, contemplando três níveis (baixo, médio e alto) de concentração de hidroxiprolina (0,5, 1,6 e 4,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em sete replicatas por nível. As amostras foram analisadas por duas analistas e em dias diferentes. Para cada amostra, foi calculado o desvio-padrão da precisão intermediária, bem como a razão de Horwitz (HorRat) (Equação 3).

$$\text{HorRat} = \frac{\text{DPR}_{\text{observado}} \text{ derivado do estudo colaborativo}}{\text{DPR}_{\text{Horwitz}} \text{ previsto na equação de Horwitz}}$$

(Equação 3)

Onde:  $\text{DPR}_{\text{observado}}$  = Desvio-padrão relativo obtido a partir do estudo de reprodutibilidade;  $\text{DPR}_{\text{Horwitz}}$  = Desvio-padrão relativo previsto a partir da equação de Horwitz (Equação 4).

$$\text{DPR}_{\text{Horwitz}}(\%) = 2^{(1-0,5 \cdot \log_{10} C)}$$

(Equação 4)

Onde: C = Concentração do analito expressa como uma fração mássica adimensional (por exemplo, 1 ppm =  $10^{-6}$ ).

Como critério de aceitação para o  $\text{DPR}_{\text{observado}}$  foi assumido o resultado obtido a partir do teste de proficiência conduzido pelo *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenz-materialien* (DRRR – Alemanha). O estudo, que contou com os dados do laboratório do MAPA, apresentou um coeficiente de variação máximo de 8%.

Para avaliar a equivalência dos resultados obtidos por diferentes analistas, foram realizadas comparações estatísticas usando o teste F e o Teste-t pareado, assumindo variâncias iguais. Inicialmente, o teste F foi aplicado para avaliar a homogeneidade das variâncias entre os resultados obtidos para as réplicas de cada analista nas três amostras analisadas. Em seguida, foi realizado Teste-t pareado para comparar os valores médios de cada conjunto de amostras entre as duas analistas. Além disso, um Teste-t global foi aplicado ao conjunto de dados completo ( $n = 42$ ) com um nível de significância de 5% para avaliar a consistência geral da precisão intermediária. Os testes tiveram como objetivo verificar se diferenças no desempenho das analistas ou na matriz amostral

influenciaram os resultados, sendo mantida a hipótese nula em todos os casos, corroborando a equivalência estatística dos dados.

### 7.3.2.3. Exatidão

#### 7.3.2.3.1. Recuperação

A avaliação da exatidão, em termos de recuperação, foi avaliada por meio da análise de três níveis de concentração, denominados C2, C4 e C6, em sete replicatas para cada nível. A recuperação analítica foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\text{Recuperação analítica} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad (\text{Equação 5})$$

As concentrações de hidroxiprolina em solvente esperadas para C2, C4 e C6 foram de 1,2; 3,6 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Resultados de recuperação entre 90 e 107% e  $\text{CV} \leq 8\%$  foram considerados satisfatórios.

#### 7.3.2.3.2. Z-score intralaboratorial

A exatidão do método verificado também foi avaliada por meio da análise de duas amostras de produto cárneo cozido distribuídas originalmente para ensaio de proficiência RVEP 232070 do *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien* (DRRR – Alemanha) e utilizadas para avaliação da exatidão como materiais de referência. As amostras tinham os seguintes valores designados de hidroxiprolina:  $0,165 \pm 0,007 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  (amostra 1) e  $0,203 \pm 0,008 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  (amostra 2). Foram considerados satisfatórios os  $|z\text{-scores}| \leq 2$ . Os *z-scores* obtidos foram calculados por meio da seguinte equação:

$$z = \frac{|\bar{x} - x_{pt}|}{s_R} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:  $\bar{x}$  = valor obtido pelo laboratório;  $x_{pt}$  = valor designado;  $s_R$  = desvio-padrão de reprodutibilidade obtido do estudo interlaboratorial.

#### 7.3.2.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) para foi calculado a partir da Equação 7:

$$LD = 3,3 * (\sigma/S)$$

(Equação 7)

Onde:  $\sigma$  = desvio-padrão da resposta do branco; S = valor da inclinação da curva de calibração.

Foi considerado como limite de quantificação (LQ) o primeiro nível de concentração da curva de calibração (C1), que corresponde a 0,60  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina 2  $\text{mL}^{-1}$ . O coeficiente de variação e a recuperação foram calculados para avaliação da precisão e da exatidão do LQ, respectivamente, preparando-se dez replicatas dessa concentração, em solvente. Os critérios de aceitação foram recuperação entre 90 e 107% e  $CV \leq 5,3\%$  (precisão).

#### 7.3.2.5. *Garantia da validade dos resultados*

O método AOAC *International* nº 990.26 (AOAC, 1993) estabelece que a confiabilidade do método é dada a partir da relação entre o teor de hidroxiprolina presente na amostra e a repetibilidade do ensaio, de acordo com a Equação 8.

$$r = 0,0131 + 0,0322 \times H$$

(Equação 8)

Onde:  $r$  = repetibilidade; H = média dos resultados de hidroxiprolina ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Dessa forma, foi realizada a análise crítica dos resultados de uma mesma amostra, obtidos em condições de repetibilidade na rotina analítica. A diferença absoluta entre dois resultados independentes não deveria exceder o valor de  $r$ . Como parte do estudo de aplicabilidade, essa avaliação foi realizada para dez amostras analisadas em duplicata.

#### 7.3.2.6. *Avaliação da incerteza de medição*

A incerteza foi estudada na concentração de 0,53 g de hidroxiprolina 100  $\text{g}^{-1}$  de amostra, com base nos dados obtidos pelas duas analistas para uma das amostras analisadas, cuja média global foi de  $0,53 \pm 0,02 \text{ g Hyp } 100 \text{ g}^{-1}$ . As demais incertezas

foram obtidas a partir das variáveis  $h$ ,  $m$  e  $a$  da equação usada para o cálculo da concentração de hidroxiprolina na amostra ( $H$ ), conforme a Equação 1. As incertezas associadas a cada variável foram combinadas, associando ainda a incerteza da precisão, tomando como base o desvio padrão da reprodutibilidade (Molognoni et al., 2019b).

#### 7.4. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE HIDRÓLISE

##### 7.4.1. Procedimento experimental

O processo alternativo de hidrólise utilizando digestão assistida por micro-ondas (DAM) foi realizado com um sistema de digestão por micro-ondas MARS 6™ (CEM Corporation, Matthews, EUA). A DAM foi conduzida sob condições controladas, otimizando o tempo de aquecimento e a pressão para aumentar a eficiência da hidrólise. As amostras foram pesadas diretamente em tubos de PTFE (MARSPress Plus™, 110 mL, rotor de 24 posições, da CEM Corporation).

Para a proposta de hidrólise alternativa, foi utilizado como referência o estudo conduzido por Messia et al. (2008) em relação às condições do micro-ondas e similaridade entre as amostras estudadas. Dois diferentes ácidos inorgânicos foram avaliados na DAM: HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A escolha do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ocorreu na tentativa de harmonizar o tipo de ácido utilizado na abertura tradicional AOAC-NMKL, e o HCl foi escolhido com base nos princípios da Química Analítica Verde (QAV) em comparação ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Meinita et al., 2015).

Um teste inicial foi realizado utilizando uma amostra de hambúrguer, que foi analisada tanto em triplicata com o protocolo completo de hidrólise convencional de amostras estabelecido pelo método AOAC-NMKL, quanto pela hidrólise proposta. A DAM foi realizada pesando-se 500 mg de amostra em balança analítica (Marte AY-220, Shimadzu, Quioto, Japão), com posterior adição de 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 mol L<sup>-1</sup>. Outra digestão foi realizada utilizando 500 mg de amostra e 10 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3,5 mol L<sup>-1</sup>. As demais condições utilizadas no micro-ondas foram: potência de 290 – 1800 Watts, tempo de rampa de 20 minutos, tempo de espera de 15 minutos e temperatura de 150°C.

Para avaliar a equivalência do método, uma amostra de ensaio de proficiência (DRRR) foi submetida aos mesmos procedimentos citados acima, sendo calculados os *z-scores* obtidos pela Equação 6. Em uma segunda fase, foi realizada uma comparação mais robusta utilizando sete réplicas da amostra do DRRR, digeridas com ácido clorídrico 6

mol L<sup>-1</sup> ou ácido sulfúrico 5 mol L<sup>-1</sup>, para tomada de decisão em relação ao tipo de ácido utilizado na DAM.

Em todas as etapas, decorrido o tempo de digestão e resfriamento no micro-ondas, as amostras foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 50 mL e avolumadas com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram filtradas e alíquotas de 5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, também avolumados com água ultrapura. O restante do procedimento (retirada de alíquota de 2,0 mL, oxidação da amostra com cloramina-T, reação com DMAB e leitura em espectrofotômetro UV-Vis) seguiram os procedimentos descritos no método normalizado AOAC-NMKL (item 7.3.1 – Procedimento experimental).

#### 7.4.2. Comparação dos métodos de hidrólise

Para comparar o desempenho do método verificado com uma abordagem alternativa de hidrólise usando digestão por micro-ondas (DAM), vários tipos de amostras foram preparadas em paralelo usando três métodos diferentes: o método verificado e implementado AOAC-NMKL (AOAC, 1993), um método alternativo de hidrólise assistida por micro-ondas utilizando ácido clorídrico e um método alternativo de hidrólise assistida por micro-ondas utilizando ácido sulfúrico, baseados no estudo conduzido por Messia et al. (2008) para DAM em produtos cárneos.

Os desempenhos dos métodos foram comparados por meio de testes estatísticos. Primeiramente, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Uma vez confirmada a normalidade, o Teste-t pareado foi utilizado para comparar os conjuntos de resultados obtidos para as mesmas amostras, considerando um nível de significância de  $p = 0,05$ .

#### 7.5. AVALIAÇÃO DA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

O “teor verde” do método normalizado AOAC-NMKL e da nova hidrólise proposta por digestão assistida por micro-ondas foi calculado pelos *softwares* AGREE (Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski, 2020) e AGREEprep (Wojnowski et al., 2022), estimando a quantidade total de volumes de amostra e reagente usados, método de hidrólise, uso de energia e resíduos gerados pelos dois métodos de preparo de amostra.

O *software* AGREE calcula o teor verde dos métodos com base em doze critérios, já o AGREEprep utiliza de dez critérios para estimar o alinhamento do

procedimento de preparo de amostras com os princípios da QAV. O Quadro 3 apresenta um sumário dos critérios utilizados em ambos os *softwares*.

Quadro 3 – Critérios adotados para a estimativa do caráter verde de métodos analíticos de acordo com os *softwares* AGREE e AGREEprep.

AGREE	AGREEprep
1. Utilização de técnicas analíticas de quantificação direta.	1. Local do preparo de amostras.
2. Quantidade de amostra e réplicas mínimas.	2. Uso de materiais perigosos.
3. Medições realizadas <i>in situ</i> .	3. Sustentabilidade, renovabilidade e reutilização de materiais.
4. Integração de processos analíticos e operações.	
5. Utilização de métodos automatizados/miniaturizados.	4. Resíduos gerados.
6. Redução de uso de agentes derivatizantes.	5. Quantidade de amostra utilizada.
7. Volume de resíduo químico gerado e subsequente tratamento.	6. Quantidade de amostras preparadas em uma hora.
8. Utilização de métodos multianalitos/multiparâmetros.	7. Integração e automatização das etapas de preparo.
9. Uso de energia.	
10. Utilização de reagentes derivados de fontes renováveis.	8. Consumo de energia por análise.
11. Uso de reagentes químicos.	9. Técnica de análise.
12. Segurança do operador.	10. Segurança do operador.

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1. VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO AOAC-NMKL

Os resultados da verificação de desempenho, incluindo parâmetros avaliados, critérios de aceitabilidade e valores obtidos, são apresentados sumariamente na Tabela 2 e discutidos nos itens subsequentes. Os critérios de aceitabilidade dos parâmetros avaliados foram estabelecidos de acordo com o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008, revisão 08) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2020).

Tabela 2 - Avaliação do valor encontrado para cada parâmetro avaliado frente ao critério de aceitabilidade proposto, estabelecido pelo Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008, revisão 08) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Parâmetro avaliado	Critério de aceitabilidade	Valor obtido	Conclusão
Linearidade	$R^2 \geq 0,99$	0,9990	Satisfatório
Precisão (repetibilidade)	$CV \leq 5,3\%$	Nível 0,5 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 7,6%	Aceitável*
		Nível 1,6 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 3,9%	Satisfatório
		Nível 4,2 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 3,8%	
Precisão intermediária	$CV \leq 8,0\%$ HorRat $\leq 2$	Nível 0,5 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 8,8%, HorRat = 1,1	Aceitável*
		Nível 1,6 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 3,3%, HorRat = 0,4	Satisfatório
		Nível 4,2 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ , CV = 4,1%, HorRat = 0,5	Satisfatório

Parâmetro avaliado	Critério de aceitabilidade	Valor obtido	Conclusão
	$Stat-t < t\text{-crítico bi-caudal}$	$-0,014 < 2,021$	Satisfatório
Exatidão (recuperação)	90 a 107%	104% (nível $1,2 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	Satisfatório
		103% (nível $3,6 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	
		104% (nível $6,0 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	
		94,5 % (Estudo de LQ)	
Exatidão ( <i>z-score</i> intralaboratorial)	$ z\text{-score}  \leq 2$	Amostra 1: <i>z-score</i> = 1,62	Satisfatório
		Amostra 2: <i>z-score</i> = 0,07	
Precisão do LQ	$CV \leq 5,3\%$	$CV \leq 1,1\%$	Satisfatório

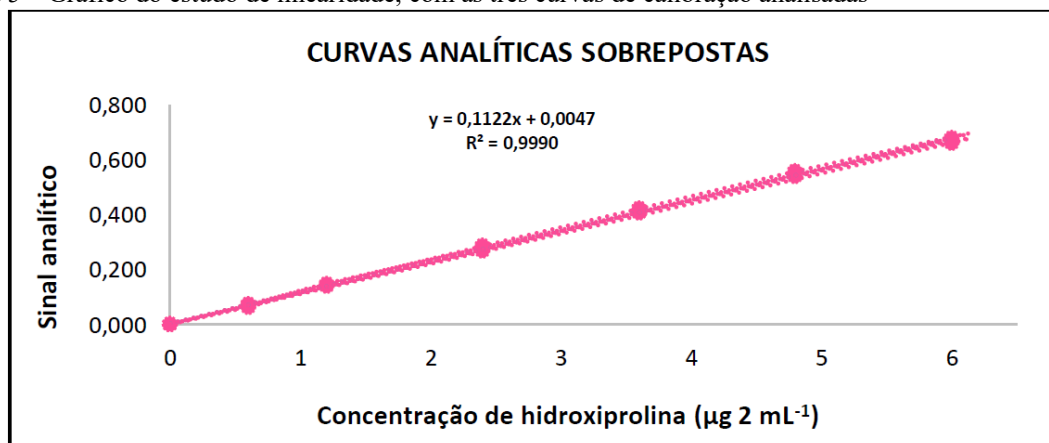
\*: Valores aceitos devido à faixa de trabalho do método compreender de  $0,6$  a  $6,0 \mu\text{g}$  de hidroxiprolina  $2 \text{ mL}^{-1}$  e a concentração de hidroxiprolina na amostra ( $0,5 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) ter se enquadrado abaixo do primeiro ponto da curva de calibração.

CV: Coeficiente de variação; LQ: Limite de quantificação;  $R^2$ : Coeficiente de determinação.

### 8.1.1. Linearidade

Após a verificação da ausência de valores *outliers* a partir do teste de Grubbs ao nível de 5% de significância, a regressão linear simples foi verificada plotando-se um gráfico onde no eixo das abscissas estão os valores de concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) e no eixo das ordenadas estão os valores de absorbância das respectivas leituras no espectrofotômetro. O gráfico com as três curvas de calibração sobrepostas está apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Gráfico do estudo de linearidade, com as três curvas de calibração analisadas

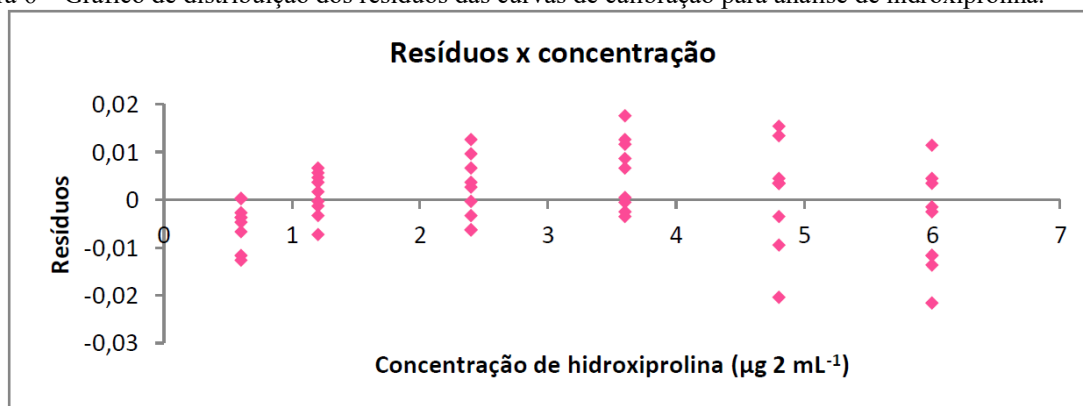


Fonte: Elaborada pela autora.

Foram calculados os coeficientes de determinação ( $R^2 = 0,9990$ ) e de correlação linear ( $R = 0,9995$ ) das três curvas preparadas com pontos em triplicata, além dos resíduos (diferença entre os valores observados e calculados pela equação da reta de regressão para cada valor de  $x$ ). A homogeneidade da variância dos resíduos (homocedasticidade) foi

verificada graficamente, constatando-se a distribuição aleatória dos resíduos ao redor do zero e a ausência de tendências sistemáticas (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico de distribuição dos resíduos das curvas de calibração para análise de hidroxiprolina.



Fonte: Elaborada pela autora.

## 8.1.2. Precisão

### 8.1.2.1. Repetibilidade

A partir da análise de diferentes amostras em três níveis de concentração distintos (0,5, 1,6 e 4,2  $\mu\text{g Hyp } 2 \text{ mL}^{-1}$ ), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados do estudo de repetibilidade para a determinação de hidroxiprolina em produtos cárneos por espectrometria molecular (valores expressos em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Replicata	Amostra 1 (presunto)	Amostra 2 (salsicha)	Amostra 3 (hambúrguer)
1	0,06	0,20	0,52
2	0,06	0,20	0,52
3	0,05	0,20	0,50
4	0,06	0,18	0,49
5	0,06	0,19	0,55
6	0,05	0,19	0,51
7	0,05	0,19	0,51
Média	0,06	0,19	0,51
[Hyp] ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	0,48	1,56	4,12
Desvio-padrão	0,00	0,01	0,02
CV (%)	7,6	3,9	3,8

[Hyp]: Concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ); CV: Coeficiente de Variação.

Como observado na Tabela 3, os coeficientes de variação (CVs) das amostras 2 e 3 atenderam ao critério de aceitação ( $\text{CV} \leq 5,3\%$ ) de acordo com o preconizado pelo Guia de Orientação do INMETRO (Brasil, 2020), apresentando CVs de 3,9 e 3,8%,

respectivamente. A amostra 1, por sua vez, apresentou um CV acima do limite recomendado. Entretanto, esse resultado foi considerado aceitável devido à baixa concentração de hidroxiprolina observada, a qual se situou em uma faixa próxima ao limite de detecção (LD) e abaixo do limite de quantificação (LQ) estabelecido para o método (seção 8.1.4). Nessas condições, variações relativas mais elevadas são esperadas e não comprometem a confiabilidade dos resultados, desde que os valores absolutos obtidos sejam consistentes entre si.

Adicionalmente, a faixa de trabalho validada para o método foi definida entre 0,6 e 6,0  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina  $2 \text{ mL}^{-1}$ , e, portanto, concentrações abaixo desse intervalo não necessitam atender aos mesmos critérios de precisão. Ainda assim, a dispersão dos dados obtidos para as sete réplicas da amostra 1 foi limitada, com resultados bastante próximos entre si, reforçando a reprodutibilidade da medição. Assim, mesmo com um CV elevado, a resposta foi considerada satisfatória para amostras em concentrações muito baixas de analito, refletindo a natureza estatística do erro relativo nessa faixa.

Ressaltamos também que, por se tratar de método em fase de implementação, não havia disponibilidade de um número amplo de amostras e, dentre as amostras disponibilizadas pelo laboratório, foram empregadas no estudo aquelas em que havia expectativa de valores em diferentes níveis.

Após análise pelo teste de Grubbs ao nível de 5% de significância, constatou-se que não houve valores *outliers*. Verificou-se, também, que as amostras analisadas apresentaram valores de desvio-padrão e CV similares aos descritos no método normalizado, apesar da diferença entre as matrizes estudadas.

#### 8.1.2.2. *Precisão intermediária*

A precisão intermediária foi avaliada com a análise de três amostras submetidas a todo o processo analítico por duas analistas, contemplando três níveis de concentração de hidroxiprolina (0,5, 1,6 e 4,2  $\mu\text{g}$   $2 \text{ mL}^{-1}$ ). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados do estudo de precisão intermediária para a determinação do teor de hidroxiprolina em produtos cárneos por espectrometria molecular (valores expressos em g 100 g<sup>-1</sup>).

Replicata	Amostra 1 (presunto)		Amostra 2 (salsicha)		Amostra 3 (hambúrguer)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0,06	0,06	0,20	0,19	0,52	0,54
2	0,06	0,06	0,20	0,20	0,52	0,53
3	0,05	0,05	0,20	0,19	0,50	0,55
4	0,06	0,06	0,18	0,20	0,49	0,53
5	0,06	0,07	0,19	0,19	0,55	0,55
6	0,05	0,07	0,19	0,19	0,51	0,50
7	0,05	0,06	0,19	0,19	0,51	0,56
Média	0,06	0,06	0,19	0,19	0,51	0,54
[Hyp] (µg 2 mL <sup>-1</sup> )	0,48	0,51	1,56	1,54	4,12	4,31
Desvio-padrão	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
CV (%)	7,6	9,1	3,9	2,7	3,8	3,4

[Hyp]: Concentração de hidroxiprolina (µg 2 mL<sup>-1</sup>); CV: Coeficiente de Variação.

Os resultados de desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) e razão de Horwitz (HorRat) calculados para o estudo de precisão intermediária estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados do desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) e razão de Horwitz (HorRat) calculados para o estudo de precisão intermediária.

Amostra	[Hyp] (g 100 g <sup>-1</sup> ) Analistas 1 e 2	Desvio-padrão Analistas 1 e 2	CV (%)	HorRat
1 (presunto)	0,06	0,01	8,8	1,1
2 (salsicha)	0,19	0,01	3,3	0,4
3 (hambúrguer)	0,53	0,02	4,2	0,5

[Hyp]: Concentrações médias de hidroxiprolina (g 100 g<sup>-1</sup>); CV: Coeficiente de variação; HorRat: *Horwitz Ratio*

Embora os resultados da amostra 1 obtidos pela analista 2 tenham resultado em um CV maior do que o esperado ( $CV \leq 8,0 \%$ ), estes foram considerados aceitáveis, adotando o mesmo critério utilizado no estudo de repetibilidade em relação à precisão de resultados de valores obtidos entre os limites de detecção e quantificação. Como a concentração de hidroxiprolina da amostra 1 (média entre as duas analistas de 0,49 µg 2 mL<sup>-1</sup>) se encontrou entre o LD e o LQ, os resultados foram então considerados aceitáveis devido à proximidade dos valores obtidos pelas duas analistas. Além disso, o valor de HorRat para essa amostra apresentou valor satisfatório (1,1), uma vez que resultados entre 0,5 e 2,0 são considerados aceitáveis (Brasil, 2020).

A comparação das variâncias obtidas para as três amostras, para cada uma das analistas, foram comparadas usando Teste-F (Tabela 6) e Teste-t pareado, demonstrando que as variâncias são equivalentes, independente das diferenças entre as matrizes e dos distintos níveis de concentração.

Tabela 6 – Resultados das variâncias das três amostras analisadas por duas analistas, em dias diferentes, por meio de teste-F.

Amostra	Variâncias	
	Analista 1	Analista 2
1 (presunto)	$2,06 \times 10^{-5}$	$3,32 \times 10^{-5}$
2 (salsicha)	$5,82 \times 10^{-5}$	$2,79 \times 10^{-5}$
3 (hambúguer)	$3,80 \times 10^{-4}$	$3,43 \times 10^{-4}$

Todos os resultados obtidos nas análises das amostras pelas duas analistas ( $n = 42$ ) também foram submetidos ao Teste-t ao nível de 5% de significância, o qual demonstrou que a hipótese nula é verdadeira, ou seja, as variâncias são equivalentes entre as duas analistas, uma vez que *Stat t* foi menor do que *t* crítico bi-caudal ( $-0,014 < 2,021$ ).

Ao comparar os resultados obtidos com outros estudos na literatura, notam-se resultados similares reportados por Alves et al. (2023), cujo método CD-EKC-DAD obteve resultados de repetibilidade (CV 2,36 – 4,39%) e precisão intermediária (CV 3,37 – 6,87%). O método normalizado AOAC-NMKL apresenta CVs de repetibilidade variando de 2,4% a 5,6% e CVs de precisão intermediária variando de 3,8% a 8,8%. Esses resultados demonstram que o desempenho do método verificado é consistente e, em alguns aspectos, comparável tanto ao método normalizado quanto a alternativas mais recentes, validando sua adequação para a determinação precisa de hidroxiprolina em diversas matrizes.

### 8.1.3. Exatidão

#### 8.1.3.1. Recuperação

As recuperações obtidas variaram entre 103 % e 104 %, com coeficientes de variação entre 2,9 % e 4,4 %, estando todos os resultados dentro dos critérios de aceitabilidade estabelecidos (recuperação entre 90 % e 107 % e  $CV \leq 8$  %) (Brasil, 2020) em todos os níveis de concentração estudados (Tabela 7).

Tabela 7 – Recuperação analítica após análise de diferentes níveis de concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) em solvente.

Replicata	C2 (1,2 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	C4 (3,6 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	C6 (6,0 $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )
1	1,17	3,62	5,97
2	1,24	3,91	6,39
3	1,30	3,57	6,12
4	1,27	3,81	6,23
5	1,27	3,79	6,23
6	1,19	3,45	6,28
7	1,28	3,78	6,54
Média	1,25	3,71	6,25
[Hyp] ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	0,05	0,16	0,18
CV (%)	3,7	4,4	2,9
REC (%)	104	103	104

[Hyp]: Concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ ); CV: Coeficiente de variação.

### 8.1.3.2. Z-score intralaboratorial

A exatidão avaliada por meio da análise de duas amostras de ensaio de proficiência (RVEP 232070 DRRR) foram utilizadas para avaliação da exatidão como materiais de referência. Os *z-scores* obtidos foram 1,62 para a amostra 1 e 0,07 para a amostra 2, sendo ambos considerados satisfatórios, de acordo com o preconizado no Guia de Orientação do INMETRO (Brasil, 2020) (Tabela 8).

Tabela 8 – Exatidão (*z-scores* intralaboratoriais) após análise de hidroxiprolina em amostras fornecidas para comparação interlaboratorial.

Amostra	[Hyp] ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	Valor designado ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	SR	<i>z-score</i>
DRRR 1	0,186	0,165	0,013	1,62
DRRR 2	0,202	0,203	0,014	0,07

DRRR: *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien*; [Hyp]: Concentração de hidroxiprolina ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ); SR: desvio-padrão de reprodutibilidade do estudo interlaboratorial.

Esses resultados confirmam tanto a precisão quanto a comparabilidade das medições obtidas na verificação de desempenho com as relatadas por outros laboratórios participantes do ensaio de proficiência. Em relação aos métodos analíticos empregados pelos laboratórios participantes, a maioria utilizou procedimentos padrão oficiais, que se baseiam na hidrólise ácida clássica seguida de detecção espectrofotométrica. Nenhum laboratório relatou explicitamente o uso de digestão assistida por micro-ondas na metodologia empregada, o que destaca o caráter inovador dessa abordagem alternativa.

#### 8.1.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado conforme a Equação 7. Como o branco não gerou sinal analítico nas análises realizadas, foi considerado como o valor do desvio-padrão da resposta do branco ( $\sigma$ ) o desvio-padrão do menor nível da curva analítica, conforme orientado no Guia do INMETRO (Brasil, 2020). Assim, foi adotado o valor de desvio-padrão obtido no estudo do limite de quantificação (LQ):  $0,01 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ . O valor de inclinação da curva usado foi o valor médio das curvas obtido no estudo de linearidade (0,1122). Assim, o valor de LD foi estimado como sendo igual a  $0,29 \mu\text{g } 2 \text{ mL}^{-1}$ .

Para o LQ, após o preparo de dez replicatas na concentração de  $0,60 \mu\text{g}$  de hidroxiprolina  $2 \text{ mL}^{-1}$  (primeiro ponto da curva de calibração), em solvente, foram obtidos os valores apresentados na Tabela 9. Os resultados experimentais atingiram valores de 1,1% para CV e 94,5% de recuperação, sendo considerados satisfatórios (critérios de aceitação: 90 a 107% para recuperação e  $\text{CV} \leq 5,3\%$  para precisão).

Tabela 9 – Estudo de precisão e exatidão do limite de quantificação de hidroxiprolina.

Replicata	C1 ( $0,6 \mu\text{g Hyp } 2 \text{ mL}^{-1}$ )
1	0,57
2	0,57
3	0,58
4	0,57
5	0,56
6	0,56
7	0,56
8	0,57
9	0,56
10	0,57
Média	0,57
Desvio-padrão	0,01
CV (%)	1,1
Recuperação (%)	94,5

Hyp: Hidroxiprolina; CV: Coeficiente de variação.

#### 8.1.5. Garantia da validade dos resultados

A análise crítica dos resultados das dez amostras analisadas em duplicata é apresentada na Tabela 10. Com exceção das amostras 1 e 6, todas as amostras geraram valores satisfatórios de  $r$ . Ainda assim, os resultados das amostras que excederam o valor de  $r$  foram aceitos devido à proximidade entre os valores das duplicatas, à baixa

concentração do analito e à baixa exatidão para expressar seus resultados com dois decimais.

Tabela 10 – Estudo de aplicabilidade e confiabilidade do método utilizando diferentes matrizes

Amostra	Replicata	[Hyp] (g 100 g <sup>-1</sup> )	Média [Hyp] (g 100 g <sup>-1</sup> )	r (%)
1 (Presunto)	1	0,09	0,10	0,00
	2	0,10		
2 (Apresentado)	1	0,11	0,12	0,01
	2	0,12		
3 (Hambúrguer)	1	0,26	0,26	0,01
	2	0,25		
4 (Salsicha)	1	0,17	0,17	0,01
	2	0,17		
5 (Mortadela)	1	0,11	0,11	0,00
	2	0,11		
6 (Presunto)	1	0,10	0,10	0,00
	2	0,11		
7 (Presunto)	1	0,06	0,06	0,00
	2	0,06		
8 (Presunto)	1	0,08	0,08	0,00
	2	0,08		
9 (Apresentado)	1	0,11	0,11	0,00
	2	0,11		
10 (Hambúrguer)	1	0,48	0,49	0,02
	2	0,51		

[Hyp]: Concentração de hidroxiprolina (g 100 g<sup>-1</sup>). *r*: Repetibilidade, em relação ao teor médio de hidroxiprolina em g 100 g<sup>-1</sup>.

### 8.1.6. Avaliação da incerteza de medição

A incerteza foi estudada na concentração de 0,53 g de hidroxiprolina 100 g<sup>-1</sup> de amostra, com base nos dados obtidos pelas duas analistas para a Amostra 3 (hambúrguer bovino), cuja média global foi de  $0,53 \pm 0,02$  g 100 g<sup>-1</sup>. As incertezas associadas a cada variável foram combinadas, associando ainda a incerteza da precisão, tomando como base o desvio padrão da reprodutibilidade. O sumário dos dados está demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Fontes de incerteza de medição e incerteza-padrão do método verificado para determinação de colágeno em produtos cárneos por espectrometria molecular

Tipo	Fonte	Estimativa de variação ( $\pm$ )	Unidade de medida	Distribuição de probabilidade	Divisor	$u_x$	Ci	$u_y$	$v_{eff}$	
B	Massa	0,00200	g	Retangular	1,730	0,001	0,0525	0,0001	$\infty$	
B	Volume final	0,20200	mL	Retangular	1,730	0,117	0,0525	0,0061	$\infty$	
A	$u_{precisão}$	0,02180	-	t-Student	2,230	0,010	1	0,0098	13	
A	$u_{curva\ analítica}$	0,0125	$\mu\text{g } 2\text{ mL}^{-1}$	t-Student	1,000	0,012	0,125	0,0016	44	
						$k =$	2,07	$u(C) =$	0,0116	26

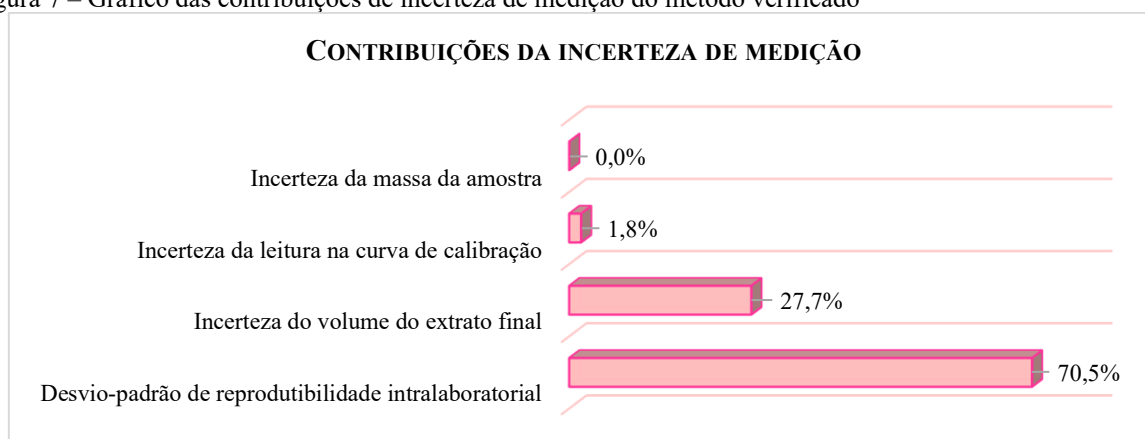
$u_x$ : Incerteza-padrão de entrada; Ci: Coeficiente de sensibilidade;  $u_y$ : Incerteza-padrão de saída;  $v_{eff}$ : graus de liberdade efetivo;  $u_{precisão}$ : Incerteza da precisão;  $U_{curva\ analítica}$ : Incerteza da curva analítica; k: Fator de abrangência;  $u(C)$ : Incerteza-padrão combinada.

Para o nível estudado, portanto, a representação final da medida é expressa da seguinte forma:

$$0,53 \pm 0,02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} (U = 4,6\%, k = 2,07)$$

O gráfico das contribuições de incerteza de medição (Figura 7) demonstra que a maior fonte da incerteza é dada pelo desvio-padrão da precisão intermediária, o que é comumente averiguado para esse tipo de método analítico. Esse parâmetro já inclui diversas fontes de incerteza do modelo de medição (como as variações de massa e de volume), bem como outras fontes de erro de menor significado que foram desconsideradas pelo modelo matemático por não serem críticas para a incerteza de medição (por exemplo, parâmetros associados à etapa de hidrólise).

Figura 7 – Gráfico das contribuições de incerteza de medição do método verificado



Fonte: Elaborada pela autora

### 8.1.7. Dados da verificação de desempenho

A comparação dos dados obtidos na verificação de desempenho no presente estudo em relação ao método oficial AOAC-NMKL está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação entre os resultados obtidos no estudo colaborativo AOAC-NMKL e na implementação do referido método no presente trabalho.

Parâmetro	Estudo AOAC-NMKL	Método implementado
Faixa de trabalho ( $\mu\text{g Hyp } 2 \text{ mL}^{-1}$ )	1,2 – 4,8	0,6 – 6,0
Coefficiente de determinação ( $R^2$ )	-	0,9990
Precisão - Repetibilidade	2,4 – 5,6%	3,8 – 7,6%
Precisão - Reprodutibilidade	3,8 – 8,8%	3,3 – 8,8%
Exatidão - Recuperação	96,1%	94,5 – 104%
Exatidão - <i>z-score</i>	-	0,07 – 1,62

-: Parâmetro não informado. Hyp: Hidroxiprolina.

De acordo com os dados discutidos anteriormente, o primeiro ponto da curva do método implementado contemplou um nível de concentração abaixo do primeiro ponto apresentado na faixa de trabalho do método normalizado AOAC-NMKL ( $0,6 \mu\text{g Hyp } 2 \text{ mL}^{-1}$ ) e um nível acima do último ponto da curva ( $6,0 \mu\text{g Hyp } 2 \text{ mL}^{-1}$ ), a fim de abranger os limites regulatórios definidos pela legislação brasileira e as características dos produtos cárneos brasileiros (Quadro 1). Apesar da inclusão desses dois pontos no método implementado, a nova curva analítica apresentou linearidade adequada ( $R^2 = 0,9990$ ), demonstrando performance satisfatória da curva analítica proposta.

Os resultados obtidos no estudo de repetibilidade apresentaram similaridade com os valores alcançados no método AOAC-NMKL. Apesar da amostra 1 no método implementado (Tabela 3) ter apresentado CV maior (7,6%), como explicado anteriormente, o resultado foi aceito, uma vez o valor obtido enquadrou-se entre o LD e o LQ. Já no estudo de precisão intermediária, o método implementado obteve, além de um menor coeficiente de variação para a amostra 2 (Tabela 5), resultados semelhantes com os obtidos no método normalizado, demonstrando concordância entre os métodos.

Em relação à exatidão do método implementado, a taxa de recuperação foi considerada satisfatória, uma vez que se enquadrou dentro da faixa obtida pelo método AOAC-NMKL (94,5 – 104% e 96,1%, respectivamente). O método implementado teve sua performance verificada, ainda, pela análise de duas amostras de proficiência, apresentando *z-scores* satisfatórios ( $\leq |2|$ ).

Os dados obtidos na verificação de desempenho do método normalizado AOAC-NMKL, portanto, apresentaram resultados satisfatórios tanto de acordo com os próprios resultados obtidos pelo método normalizado, quanto pelos critérios estabelecidos no Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO, ambos documentos utilizados como referência para a implementação do método deste trabalho.

## 8.2. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE HIDRÓLISE

### 8.2.1. Comparação entre métodos de hidrólise

A primeira avaliação do método de hidrólise através de digestão assistida por micro-ondas (DAM) foi realizada com a utilização de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup>, para comparação com o protocolo oficial AOAC-NMKL. Na primeira análise da amostra selecionada (hambúrguer), juntamente com uma réplica de material de referência certificado (DRRR), foram obtidos os seguintes resultados para todos os métodos de hidrólise citados (Tabela 13):

Tabela 13 – Resultados da determinação de Hyp (g 100 g<sup>-1</sup>) comparando o método normalizado AOAC-NMKL e a digestão assistida por micro-ondas utilizando ácido clorídrico ou sulfúrico.

Método	Hyp (g 100 g <sup>-1</sup> )	Média ± DP	CV (%)	Z-score (DRRR)
AOAC-NMKL	0,074	0,076 ± 0,003	3,55	0,39
	0,074			
	0,079			
DAM HCl 6 mol L <sup>-1</sup>	0,067	0,066 ± 0,001	1,60	1,82
	0,067			
	0,065			
DAM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup>	0,060	0,061 ± 0,011	17,99	-2,73
	0,051			
	0,073			

CV: coeficiente de variação. DAM: digestão assistida por micro-ondas. DP: desvio-padrão. DRRR: *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien*.

Os resultados do *z-score* para o material de referência certificado (DRRR) foram satisfatórios tanto para o método convencional (*z-score* = 0,39) quanto para o método

com HCl 6 mol L<sup>-1</sup> (*z-score* = -1,82), enquanto a digestão com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentou um *z-score* questionável (-2,73). Apesar disso, uma comparação estatística das variâncias entre os protocolos convencional e com HCl não revelou diferenças significativas.

Na segunda avaliação, as sete replicatas do DRRR foram analisadas novamente com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nesse teste, foi utilizada uma concentração maior (5 mol L<sup>-1</sup>) de ácido, a fim de realizar a hidrólise de maneira mais efetiva. Todos os 14 resultados obtidos para as duas hidrólises propostas obtiveram valores de *z-scores* satisfatórios (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados da determinação de Hyp (g 100 g<sup>-1</sup>) comparando as aberturas utilizando HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mol L<sup>-1</sup>.

Digestão assistida por micro-ondas	Hyp (%) Média ± Desvio-padrão	CV (%)	<i>z-score</i>
HCl 6 mol L <sup>-1</sup>	0,095 ± 0,009	9,4	-1,09
			-0,22
			0,47
			-1,31
			0,14
			0,38
			1,60
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mol L <sup>-1</sup>	0,094 ± 0,005	5,30	-0,12
			0,36
			-0,31
			-0,08
			-0,55
			-1,00
			0,66

CV: coeficiente de variação. Hyp: hidroxiprolina.

O teste de Shapiro-Wilk confirmou a distribuição normal para ambos os conjuntos de dados ( $p > 0,05$ ), e o Teste-t pareado não indicou diferença significativa entre os dois protocolos de digestão no nível de confiança de 95%. A partir desses resultados, optou-se pela DAM utilizando HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, uma vez que esse ácido, em comparação ao sulfúrico, apresenta maior conformidade com os princípios da QAV (Zhang et al., 2021).

Em relação à aplicabilidade do método, foram analisadas amostras comparando o método normalizado AOAC-NMKL com o novo método de preparação assistida por micro-ondas utilizando HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. Além das oito amostras comerciais, a amostra de ensaio de proficiência do DRRR também foi analisada novamente. Para a amostra de

proficiência, ambas as abordagens de preparo obtiveram resultados satisfatórios (*z-score*  $\leq |2|$ ). Os resultados do estudo de aplicabilidade são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados do estudo de aplicabilidade para apresuntado, presunto e hambúrguer: comparação dos métodos AOAC-NMKL e DAM utilizando HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e conformidade dos produtos de acordo com as legislações brasileiras.

Amostra	Método DAM HCl (g Hyp 100 g <sup>-1</sup> )	Método AOAC-NMKL (g Hyp 100 g <sup>-1</sup> )	Valor de p	Significância	% COL AOAC-NMKL	% COL DAM HCl 6 mol L <sup>-1</sup>	Proteína (g 100 g <sup>-1</sup> )	% TCC/PB (AOAC / DAM HCl)	Conformidade
Hambúrguer 1	0,308672 <sup>a</sup>	0,224753 <sup>a</sup>	0,268600	Não significativo	2,47	3,05	18,78	13,15 16,22	Sim
Hambúrguer 2	0,224753 <sup>a</sup>	0,212232 <sup>b</sup>	0,031405	Significativo	1,80	1,70	14,08	12,77 12,06	Sim
Hambúrguer 3	0,071531 <sup>b</sup>	0,081055 <sup>a</sup>	0,025879	Significativo	0,57	0,65	14,86	3,83 4,36	Sim
Hambúrguer 4	0,241433 <sup>b</sup>	0,309477 <sup>a</sup>	0,028572	Significativo	1,93	2,48	15,29	12,63 16,19	Sim
Hambúrguer 5	0,374924 <sup>a</sup>	0,309812 <sup>a</sup>	0,153346	Não significativo	3,00	2,48	17,84	16,81 13,89	Sim
Apresuntado 6	0,102519 <sup>a</sup>	0,108727 <sup>a</sup>	0,407938	Não significativo	0,82	0,87	15,22	5,39 5,71	Sim
Apresuntado 7	0,102155 <sup>a</sup>	0,107058 <sup>a</sup>	0,180556	Não significativo	0,82	0,86	16,92	4,83 5,06	Sim
Presunto 8	0,097956 <sup>a</sup>	0,104177 <sup>a</sup>	0,608751	Não significativo	0,78	0,83	16,94	4,63 4,92	Sim

<sup>a, a</sup>: variâncias sem diferença significativa. <sup>b, a</sup>: variâncias com diferença significativa. COL: colágeno. DAM: digestão assistida por micro-ondas. Hyp: hidroxiprolina. TCC/PB: teor de tecido conjuntivo colagenoso em relação ao teor total de proteína do produto.

As réplicas das amostras de hambúrguer (n = 5), apesuntado (n = 2) e presunto (n = 1) apresentaram resultados de teores de hidroxiprolina estatisticamente diferentes, dependendo do tipo de produto. Testes-t pareados foram realizados para cada amostra individual. Os resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em algumas amostras, particularmente entre os produtos de hambúrguer (Hambúrgueres 2, 3 e 4), indicando que o método DAM produz valores que diferem sistematicamente do protocolo tradicional. Amostras de carnes processadas, como Apesuntados 6 e 7 e Presunto 8, não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que a composição da matriz do hambúrguer pode influenciar a eficiência da hidrólise, possivelmente devido ao maior teor de fibras encontradas nesse tipo de matriz. A partir disso, foi realizada uma análise das informações nutricionais e da composição dos produtos analisados (Tabela 16), evidenciando que a composição das amostras que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Hambúrgueres 2, 3 e 4) são justamente as amostras que apresentam composição mista (carnes de frango, bovina e suína), indicando uma maior heterogeneidade da matriz devido à natureza de seus ingredientes, podendo esta ser um dos fatores que influenciaram na digestão assistida por micro-ondas dessas amostras.

Tabela 16 – Composição dos produtos cárneos analisados em relação aos ingredientes, teores proteico, de gordura e de carboidratos presentes nas amostras, em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

<b>Produto</b>	<b>Ingredientes (resumo)</b>	<b>Proteínas (<math>\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math>)</b>	<b>Gorduras totais (<math>\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math>)</b>	<b>Carboidratos (<math>\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math>)</b>
Hambúrguer 1	Carne bovina, gordura bovina	19,0	21,0	0,0
Hambúrguer 2	Frango com pele, carne bovina, soja, aromatizante defumado	15,0	15,0	1,7
Hambúrguer 3	Carne bovina/frango, soja, fécula, aromatizante	7,1	15,2	1,4
Hambúrguer 4	Frango, carne suína, gordura de porco, proteína de soja, aromatizante	14,0	15,0	0,4
Hambúrguer 5	Carne bovina (picanha, recortes, costela)	17,0	20,0	0,0
Apesuntado 6	Carne suína, fécula, proteína de soja, aditivos, corante cochonilha	14,0	28,3	7,3
Apesuntado 7	Carne suína, derivados de soja	14,0	27,3	1,6
Presunto 8	Pernil suíno, fécula, soja, aromatizante, corante cochonilha	10,0	15,5	0,8

Essas descobertas ressaltam a necessidade de harmonização de métodos ao comparar resultados de diferentes fluxos de trabalhos analíticos e sugerem que o método DAM, embora eficiente e alinhado aos princípios da química verde, pode exigir ajustes ou calibração para garantir a comparabilidade com dados gerados pelo protocolo AOAC-NMKL.

O teor proteico dessas amostras também foi determinado utilizando o método de referência do MAPA (AOAC, 1992). Além disso, a porcentagem de colágeno em relação à proteína foi calculada para todas as amostras, e a conformidade foi confirmada para todos os produtos analisados, como apresentado na Tabela 15.

Em conjunto, esses resultados corroboram com a adoção do ácido clorídrico como uma alternativa viável e eficiente para a digestão das amostras. Comparado ao ácido sulfúrico, o HCl é menos perigoso do ponto de vista da química verde e permite um preparo mais rápido da amostra (Meinita et al., 2015). No entanto, recomenda-se uma otimização adicional para determinar o volume ideal de ácido e o tempo de exposição ao micro-ondas, a fim de garantir consistência e reprodutibilidade da metodologia proposta.

### 8.3. QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

O método adaptado demonstrou uma redução substancial no consumo de reagentes e no tempo de processamento, alinhando-se aos princípios da Química Analítica Verde (QAV). Em comparação ao método normalizado AOAC-NMKL, o tempo de digestão da amostra foi reduzido em mais de 96%, de 960 minutos (16 horas na estufa) para apenas 35 minutos usando digestão assistida por micro-ondas (DAM). Além disso, o volume de ácido utilizado diminuiu em 67%, de 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup> para apenas 10 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>.

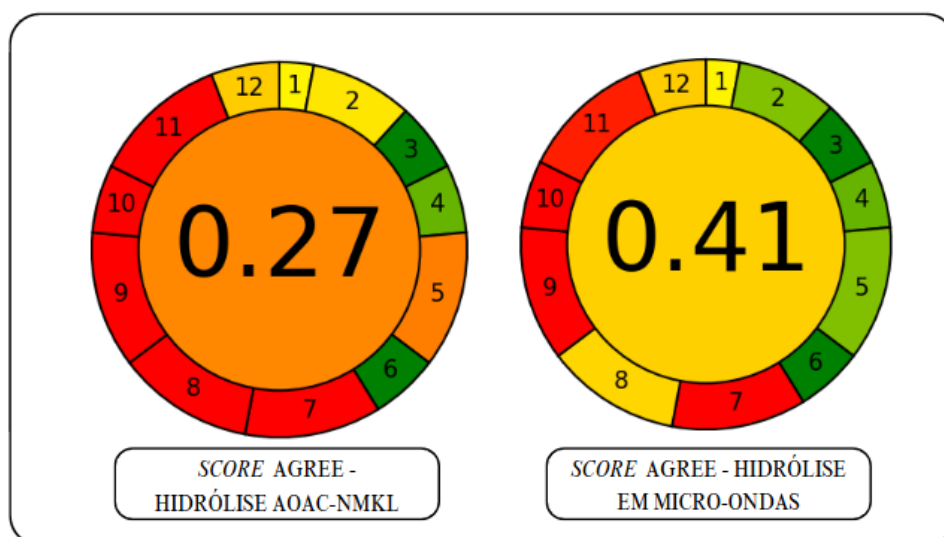
Além da eficiência, a substituição do ácido sulfúrico por ácido clorídrico também representa uma melhoria ambiental considerável. No contexto da QAV, o HCl é considerado mais adequado do que o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para certas aplicações, como o pré-tratamento de biomassa, devido à sua eficácia em temperaturas mais baixas e ao perfil de degradação mais favorável (Zhang et al., 2021). Essas características contribuem para menores demandas de energia e redução no volume de resíduos químicos gerados.

No geral, os resultados indicaram que o método de digestão assistida por micro-ondas para quantificação de colágeno não só melhora o rendimento analítico, mas também reduz consideravelmente o impacto ambiental. Ao minimizar o uso de reagentes e o

volume gerado de resíduos, mantendo a conformidade regulatória e o desempenho analítico, esse método representa um avanço relevante na análise de produtos cárneos sustentáveis e está alinhado com as tendências globais atuais no universo da química de alimentos.

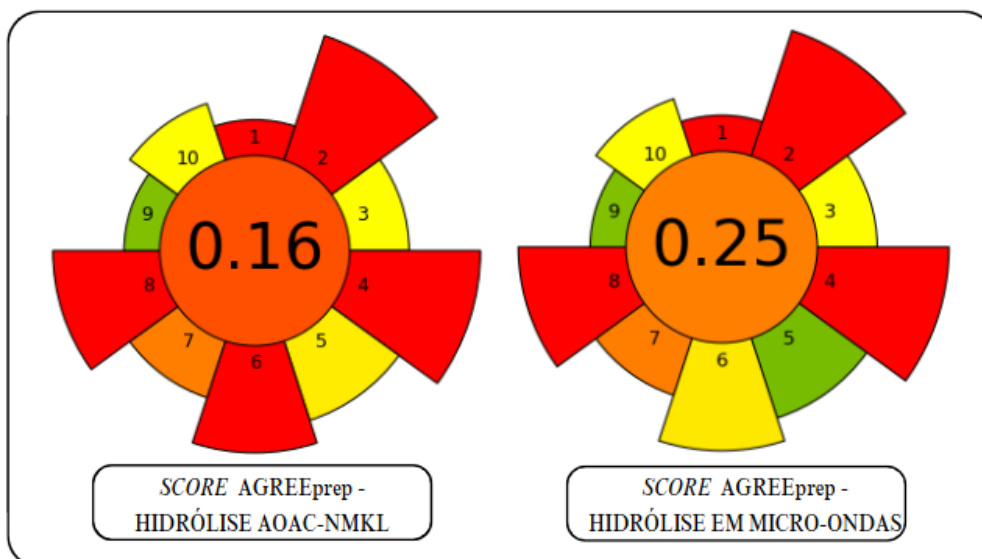
A comparação entre os dois métodos avaliados em termos de critérios de QAV revela uma vantagem do método de DAM sobre o procedimento AOAC-NMKL. Por exemplo, com base na pontuação AGREE para o método proposto, a abordagem assistida por micro-ondas obteve uma pontuação de 0,41, enquanto o método normalizado AOAC-NMKL atingiu uma pontuação menor e, portanto, menos favorável, de 0,27 (Figura 8). Quando avaliado pela ferramenta AGREEprep, que foca especificamente nas etapas de preparo da amostra, o método de hidrólise por micro-ondas obteve pontuação de 0,25, comparado a 0,16 do método AOAC-NMKL (Figura 9).

Figura 8 – Comparação entre o teor verde das hidrólises realizadas de acordo com o método tradicional AOAC-NMKL e pela digestão assistida por micro-ondas por meio do *software* AGREE.



Fonte: Elaborada pela autora por meio do *software* AGREE.

Figura 9 – Comparação entre o teor verde das hidrólises realizadas de acordo com o método tradicional AOAC-NMKL e pela digestão assistida por micro-ondas por meio do *software* AGREEprep.



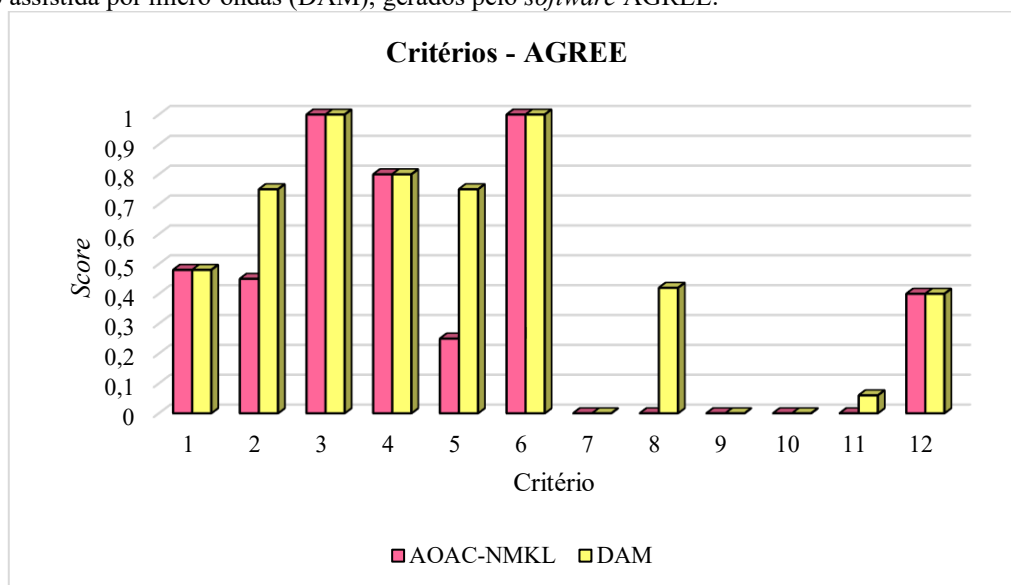
Fonte: Fonte: Elaborada pela autora por meio do *software* AGREEprep.

Em ambos os sistemas de avaliação, pontuações mais próximas a 1 indicam melhor alinhamento com os princípios da química analítica verde. Nas seções a seguir, é apresentada uma comparação entre os dois métodos, de acordo com os critérios de cada um dos *softwares*, apresentados no Quadro 3.

### 8.3.1. Critérios do *software* AGREE

Os *scores* obtidos no *software* AGREE para as aberturas de acordo com o método normalizado AOAC-NMKL e DAM apresentaram diferenças em alguns dos critérios avaliados. O gráfico apresentado na Figura 10 destaca o aumento dos *scores* nos critérios 2, 5, 8 e 11.

Figura 10 – Comparação dos *scores*, por critério, das hidrólises realizadas pelos métodos AOAC-NMKL e digestão assistida por micro-ondas (DAM), gerados pelo *software* AGREE.



O critério 2 estabelece a quantidade mínima de amostra necessária para a análise, a qual reduziu de 4,00 g no método normalizado AOAC-NMKL para 0,50 g no método DAM, indicando uma diferença positiva para o método de digestão assistida por micro-ondas.

Já o critério 5 está relacionado à utilização de métodos automatizados e/ou miniaturizados. Em relação ao critério 5, o método de preparo de amostras AOAC-NMKL possui grau de automatização médio (semiautomatizado), uma vez que a hidrólise é realizada em estufa contendo apenas capacidade operacional de alteração de temperatura, e a finalização da etapa de hidrólise obrigatoriamente exigir a presença de um operador para retirada das amostras da estufa, além de não ser miniaturizado, devido à quantidade de reagente utilizado para hidrolisar as amostras. Já em relação ao método DAM, o micro-ondas apresenta grau de automatização superior (automático), pois o micro-ondas opera com sensores de temperatura, pressão, potência e programação de tempo fixos, tornando o procedimento mais preciso e seguro, uma vez que não necessita da presença de um operador para a finalização dessa etapa, utilizando, além disso, menor volume de reagente quando comparado ao método normalizado AOAC-NMKL.

O critério 8, por sua vez, avalia a quantidade de amostras que podem ser preparadas em 1 h. No método AOAC-NMKL não é possível preparar nenhuma amostra, uma vez que apenas para a etapa de hidrólise em estufa são necessárias 16 h. O método DAM, por sua vez, leva 35 min para a realização da hidrólise. Nessa abordagem podem

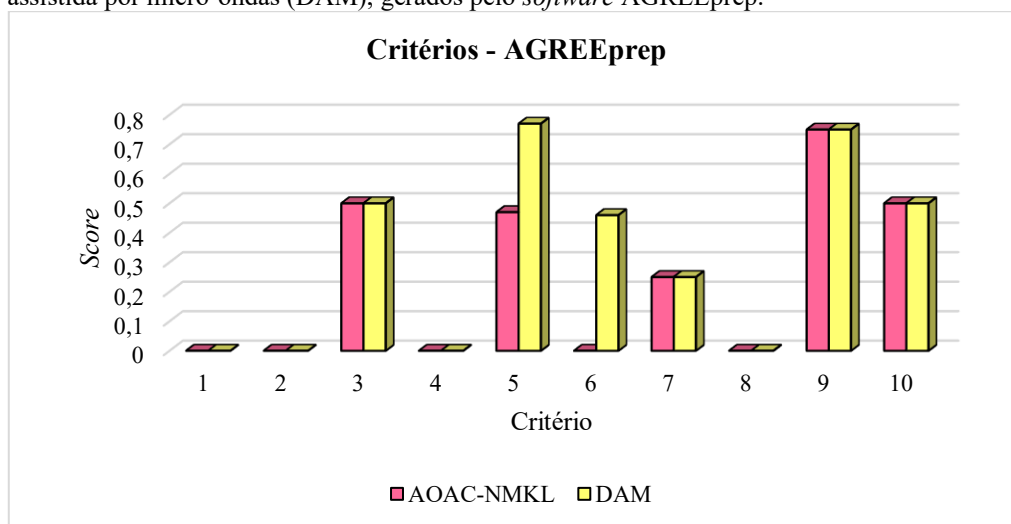
ser preparadas até sete amostras em triplicata junto a um branco analítico, uma vez que o rotor do micro-ondas possui capacidade para até 24 tubos por batelada de análise.

Por fim, o critério 11 do AGREE está relacionado ao volume utilizado de reagentes tóxicos, apresentando uma melhora discreta no método DAM, pela utilização de menor volume de HCl, em contrapartida ao volume utilizado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no método normalizado AOAC-NMKL.

### 8.3.2. Critérios do *software* AGREEprep

A diferença de *scores* para os métodos de hidrólise AOAC-NMKL e DAM gerados a partir do *software* AGREEprep apresenta menor diferença quando comparada às pontuações do AGREE, onde o método DAM obteve *score* quase 50% superior. Ainda assim, foram obtidos resultados superiores da DAM nos critérios 5 e 6 no AGREEprep, o que contribuiu para um *score* sutilmente superior no método de preparo de amostras da digestão por micro-ondas em relação à hidrólise tradicional do método normalizado AOAC-NMKL (Figura 11).

Figura 11 - Comparação dos *scores*, por critério, das hidrólises realizadas pelos métodos AOAC-NMKL e digestão assistida por micro-ondas (DAM), gerados pelo *software* AGREEprep.



No critério 5 é considerada a quantidade utilizada de amostra para o ensaio, a qual diminuiu de 4,00 g no método AOAC-NMKL para 0,50 g na DAM, como visto no critério 2 do *software* AGREE, o qual também apresentou aumento do *score* da DAM nesse quesito. Já o critério 6 do AGREEprep, assim como o critério 8 do AGREE, também avalia o fluxo de amostras preparadas em 1 h, sendo o *score* superior no método DAM, como apresentado anteriormente.

Para ambos os *softwares*, embora o processo de preparo ainda não seja totalmente "verde", devido à natureza de certas etapas – como o uso de agentes complexantes e reagentes oxidativos – o método de micro-ondas usando ácido clorídrico reduz consideravelmente o impacto ambiental e a periculosidade das substâncias envolvidas quando comparado ao procedimento AOAC-NMKL convencional, demonstrando um maior alinhamento com os princípios da Química Analítica Verde pela DAM.

## COSIDERAÇÕES FINAIS

O desempenho do método normalizado AOAC-NMKL foi adequado em todos os parâmetros de validação, com linearidade satisfatória ( $R^2 = 0,9990$ ), exatidão adequada (recuperações de 103–104%) e repetibilidade e precisão consistentes ( $CV \leq 8,8\%$ ). O limite de quantificação foi adequado às necessidades regulatórias e a incerteza de medição permaneceu dentro dos limites aceitáveis ( $U = 4,6\%$ ). A aplicabilidade do método implementado em amostras de produtos cárneos provenientes de estabelecimentos inspecionados pelo SIF apresentou resultados satisfatórios em rotina analítica, atendendo ao propósito do serviço de fiscalização.

A proposta da digestão assistida por micro-ondas (DAM) usando ácido clorídrico representa um avanço considerável na determinação de hidroxiprolina e, conseqüentemente, de colágeno, em produtos cárneos. Em comparação ao método AOAC-NMKL, o protocolo DAM reduziu o tempo de digestão em mais de 96% e o volume de ácido utilizado em 67%, utilizando um reagente mais alinhado com os princípios da Química Analítica Verde ( $HCl$  vs.  $H_2SO_4$ ), tornando o procedimento notavelmente mais ecológico e seguro para os analistas. A comparação estatística utilizando material de ensaio de proficiência confirmou a equivalência entre os métodos em termos de desempenho analítico.

De maneira geral, o método de hidrólise por DAM está alinhado aos princípios da Química Analítica Verde e oferece uma alternativa eficaz, escalável e ambientalmente correta para a quantificação de colágeno em laboratórios oficiais e na indústria de carnes. Quando aplicado a amostras de produtos cárneos provenientes de estabelecimentos inspecionados, o método gerou resultados válidos. Apesar disso, ainda são necessárias otimizações complementares para garantir a reprodutibilidade da metodologia proposta. A conformidade de todas as amostras utilizadas nos estudos deste trabalho evidencia o comprometimento pela qualidade dos produtos cárneos brasileiros, sendo essencial o controle da autenticidade desses produtos, além de fornecer o respaldo necessário pelos laboratórios oficiais de controle quanto às ações de intensificação da fiscalização de carnes e seus subprodutos.

O método de hidrólise empregado pela AOAC-NMKL é atualmente aplicado nos laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para monitorar e avaliar a conformidade de produtos cárneos com os limites regulatórios para teor de colágeno. O protocolo DAM alternativo será proposto formalmente como um

aprimoramento do método oficial, com o objetivo de aumentar o rendimento analítico e expandir consideravelmente a capacidade de análises fiscais de rotina.

## REFERÊNCIAS

- ABADI, M. D. M. et al. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1–12, 2012.
- AHMAD, M. I. et al. Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, n. September 2023, 2024.
- ALAM, M. R. et al. Sources, extractions and applications of bio-maker collagen – A review. **Biomedical Engineering Advances**, v. 4, p. 100064, 2022.
- ALEXANDRETTI, C. et al. Structural and techno-functional properties of bovine collagen and its application in hamburgers. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 369–377, 2019.
- ALVES, V. R. et al. Development of a new method for the determination of 4-hydroxyproline as a measurement of collagen content in meat products and dietary supplements by cyclodextrin-assisted electrokinetic chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 122, p. 105431, 2023.
- ANTONIEWSKI, M. N.; BARRINGER, S. A. Meat shelf-life and extension using collagen/gelatin coatings: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 7, p. 644–653, 2010.
- ANZANI, C. et al. Optimising the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives: Nutritional, technological and allergenicity challenges. **Food Research International**, v. 137, p. 109575, 2020.
- AOAC. Official Method 992.15 - Crude Protein in Meat and Meat Products Including Pet Foods, Combustion Method. **AOAC International**, 1992.
- AOAC. Official Method 990.26 - Hydroxyprolin in Meat and Meat Products, Colorimetric Method. **AOAC International**, 1993.
- ASTRUC, T. Connective tissue: Structure, function, and influence on meat quality. **Encyclopedia of Meat Sciences**, v. 1, p. 321–328, 2014.
- BALLIN, N. Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 577–587, 2010.
- BARRIOS, C. et al. A techno-economic perspective on a microwave extraction process for efficient protein recovery from agri-food wastes. **Industrial Crops & Products**, v. 186, n. 115166, 2022.
- BELLONI, J. A. et al. Automatic flow-batch system for the sample treatment and determination of hydroxyproline in sausages. **Talanta**, v. 89, p. 526–530, 2012.
- BITENCOURT, G. R. et al. Elemental determination in carbon nanotubes by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after a greener and simple microwave-assisted digestion method. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 206, n. 106709, 2023.

BOU-GHARIOS, G.; ABRAHAM, D.; DE CROMBRUGGHE, B. **Type I collagen structure, synthesis, and regulation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

BRASIL. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) – Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2020.

BRASIL. Portaria nº 384, de 25 de agosto de 2021 - Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do hambúrguer. **Diário Oficial da União**, 2021.

BRASIL. Portaria SDA nº 701, de 17 de novembro de 2022 - Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do apesuntado. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Diário Oficial da União**, 2022a.

BRASIL. Portaria SDA nº 706, de 28 de novembro de 2022 - Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do fiambre. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Diário Oficial da União**, 2022b.

BRASIL. Portaria SDA nº 724, de 23 de dezembro de 2022 - Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do hambúrguer. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Diário Oficial da União**, 2022c.

BRASIL. Portaria SDA nº 765, de 6 de abril de 2023 - Aprova os Requisitos Técnicos de Identidade e Qualidade do presunto cozido, presunto cozido superior, presunto cozido tenro e do presunto de aves. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Diário Oficial da União**, 2023.

BREWER, M. S. Reducing the fat content in ground beef without sacrificing quality: A review. **Meat Science**, v. 91, n. 4, p. 385–395, 2012.

CAMPOS, L. D. et al. Collagen supplementation in skin and orthopedic diseases: A review of the literature. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2023.

CERDÀ, V.; PHANSI, P.; FERREIRA, S. From mono- to multicomponent methods in UV-VIS spectrophotometric and fluorimetric quantitative analysis – A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 157, 2022.

CERQUEIRA DA SILVA, V. H. et al. Chemometric tools in the optimization of a microwave-assisted digestion procedure for guarana-based drink samples and data analysis from elemental, caffeine, and epicatechin contents. **Food Chemistry**, v. 365, n. 130468, 2021.

CERVEIRA, C. et al. Evaluation of microwave-assisted ultraviolet digestion method for rice and wheat for subsequent spectrometric determination of As, Cd, Hg and Pb. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, n. 103585, 2020.

CISSELL, D. D. et al. A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue. **Tissue Engineering, Part C**, v. 23, n. 4, p. 243–250, 2017.

COLGRAVE, M. L.; ALLINGHAM, P. G.; JONES, A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass

spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1212, n. 1–2, p. 150–153, 2008.

CORA JOFRE, F. et al. Assessing the greenness of optimized ultrasound and infrared assisted extraction through analytical metrics. **Advances in Sample Preparation**, v. 5, n. December 2022, p. 100054, 2023.

DA SILVA, C. M. L.; SPINELLI, E.; RODRIGUES, S. V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. **Food Chemistry**, v. 173, p. 619–623, 2015.

DAMODARAN, S.; WANG, S. Ice crystal growth inhibition by peptides from fish gelatin hydrolysate. **Food hydrocolloids**, v. 70, p. 46–56, 2017.

DE MELO, A. P. Z. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 7, p. 1826–1842, 2022.

DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. **Meat Science**, v. 119, p. 62–68, 2016.

DEOLINDO, C. T. P. et al. Sample pooling and incurred samples improve analytical throughput and quality control of lipophilic phycotoxins screening in bivalve mollusks. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2023.

DING, S. et al. Perception and response of skeleton to mechanical stress. **Physics of Life Reviews**, v. 49, n. March, p. 77–94, 2024.

FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTE-LHOUELIER, V. The “ sisters ”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. v. 51, p. 65–75, 2016.

GAHLAWAT, S.; NANDA, V.; SHREIBER, D. I. Designing collagens to shed light on the multi-scale structure–function mapping of matrix disorders. **Matrix Biology Plus**, v. 21, n. November 2023, p. 100139, 2024.

GAO, Y. et al. Ultra-high pressure-assisted preparation of cowhide gelatin as a promising fat substitute: Improve the nutrition ratio and antioxidant capacity of beef patties. **Food Research International**, v. 157, p. 111260, 2022.

GHANAEIAN, A.; SOHEILIFARD, R. Mechanical elasticity of proline-rich and hydroxyproline-rich collagen-like triple-helices studied using steered molecular dynamics. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 86, p. 105–112, 2018.

GOMEZ-GUILLEN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

GONÇALVES, S. et al. Simultaneous extraction/derivatization for the analysis of sulfite by capillary electrophoresis: A high-throughput reference method to meet the demand of seafood inspection. **Food Research International**, v. 161, p. 111780, 2022.

HAJJ, A. W. et al. Hydrolyzed collagen: Exploring its applications in the food and beverage industries and assessing its impact on human health – A comprehensive review. **Heliyon**, v. 10, n. 16, p. e36433, 2024.

HAN, S. et al. Evaluation of various microwave-assisted acid digestion procedures for the determination of major and heavy metal elements in municipal solid waste incineration fly ash. **Journal of Cleaner Production**, v. 321, n. 128922, 2021.

HJELM, L. et al. Partial substitution of fat with rye bran fibre in Frankfurter sausages – Bridging technological and sensory attributes through inclusion of collagenous protein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 607–617, 2019.

HOFMAN, K. et al. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. **Analytical Biochemistry**, v. 417, n. 2, p. 289–291, 2011.

IAHNKE, A. O. E S. et al. Effect of moderate electric field on the properties of gelatin capsule residue-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 29–35, 2019.

IMAM, M. S.; ABDELRAHMAN, M. M. How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 38, n. e00202, 2023.

IRASTORZA, A. et al. The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications. **Food Hydrocolloids**, v. 116, p. 106633, 2021.

JRIDI, M. et al. Improvement of the physicochemical, textural and sensory properties of meat sausage by edible cuttle fish gelatin addition. **Food Bioscience**, v. 12, p. 67–72, 2015.

KABAHA, K. et al. Accelerated hydrolysis method to estimate the amino acid content of wheat (*Triticum durum* Desf.) flour using microwave irradiation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2958–2965, 2011.

KAKU, M.; YAMAUCHI, M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 58, n. 4, p. 193–207, 2014.

KAMARUZAMAN, N.; YUSOP, S. M. Determination of stability of cosmetic formulations incorporated with water-soluble elastin isolated from poultry. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 6, p. 101519, 2021.

KUCHARZ, E. J. **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. [s.l: s.n.].

LEE, J. et al. Microwave-assisted digestion method using diluted nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of major and minor elements in milk samples by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 373, n. 131483, 2022.

LEE, J.; PARK, Y. S.; LEE, D. Y. Fast and green microwave-assisted digestion with diluted nitric acid and hydrogen peroxide and subsequent determination of elemental composition in brown and white rice by ICP-MS and ICP-OES. **LWT**, v. 173, n. 114351, 2023.

- LEPETIT, J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 960–967, 2008.
- LI, X. et al. Swelling and microwave-assisted hydrolysis of animal keratin in ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 341, p. 117306, 2021.
- LI, X. et al. Meta-analysis of the relationship between collagen characteristics and meat tenderness. **Meat Science**, v. 185, p. 108717, 2022.
- LIU, Q. et al. Microwave-assisted alkali hydrolysis for cellulose isolation from wheat straw: Influence of reaction conditions and non-thermal effects of microwave. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, n. 117170, 2021.
- MARY LEEMA, J. T.; PERSIA JOTHY, T.; DHARANI, G. Rapid green microwave assisted extraction of lutein from *Chlorella sorokiniana* (NIOT-2) – Process optimization. **Food Chemistry**, v. 372, 2022.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. A Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Hydroxyproline as a Collagen Content Index in Meat Products. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 464–470, 2012.
- MEINITA, M. D. N. et al. Catalytic efficiency of sulfuric and hydrochloric acids for the hydrolysis of *Gelidium latifolium* (Gelidiales, Rhodophyta) in bioethanol production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 27, p. 108–114, 2015.
- MESSIA, M. C. et al. Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 401–409, 2008.
- MIKULSKI, D.; KŁOSOWSKI, G. Cellulose hydrolysis and bioethanol production from various types of lignocellulosic biomass after microwave-assisted hydrotropic pretreatment. **Renewable Energy**, v. 206, p. 168–179, 2023.
- MILLER, E. J.; MATUKAS, V. J. Chick cartilage collagen: a new type of  $\alpha 1$  chain not present in bone or skin of the species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 64, n. 4, p. 1264–1268, 1969.
- MIN LAO, Y. et al. Development and validation of single-step microwave-assisted digestion method for determining heavy metals in aquatic products: Health risk assessment. **Food Chemistry**, v. 402, n. 134500, 2023.
- MOLOGNONI, L. et al. Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents. **Food Research International**, v. 125, n. August, p. 108608, 2019a.
- MOLOGNONI, L. et al. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. **Food Chemistry**, v. 282, p. 147–152, 2019b.
- MORA, L.; TOLDRÁ, F. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. **Current Opinion in Food Science**, v. 49, p. 100973, 2023.

MOREDA-PIÑEIRO, J. et al. Selenium species determination in foods harvested in Seleniferous soils by HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy. **Food Research International**, v. 111, p. 621–630, 2018.

MULLER, E. I. et al. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 257–261, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman, 2009.

OLIVEIRA, V. DE M. et al. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, 2021.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 2020.

PEREIRA, R. M. et al. Multitechnique determination of metals and non-metals in sports supplements after microwave-assisted digestion using diluted acid. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 235–241, 2019.

PURSLOW, P. P. The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

RAMACHANDRAN, G. N.; KARTHA, G. Structure of collagen. **Nature**, v. 176, n. 4482, p. 593–595, 1955.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1996.

REESE-PETERSEN, A. L. et al. Evaluation of a novel biomarker of type XXVIII collagen formation, PRO-C28, in samples from cancer and heart failure with preserved ejection fraction patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114272, 2021.

RICH, A.; CRICK, F. H. C. The structure of collagen. **Nature**, v. 176, n. 4489, p. 915–916, 1955.

SALGADO, D. C. Distribuição de colágeno na concha nasal inferior de pacientes com rinite alérgica ou idiopática. **Tese - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo**, p. 76, 2014.

SALIM, N. V et al. Comprehensive review on collagen extraction from food by-products and waste as a value-added material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 278, p. 134374, 2024.

- SELVARAJ, V. et al. Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. **Differentiation**, v. 136, n. 100757, 2024.
- SENTANDREU, M. Á.; SENTANDREU, E. Authenticity of meat products: Tools against fraud. **Food Research International**, v. 60, p. 19–29, 2014.
- SHAO, L. et al. Microwave-assisted efficient depolymerization of alkaline lignin in methanol/formic acid media. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 238–243, 2018.
- SIADAT, S. M.; RUBERTI, J. W. Mechanochemistry of collagen. **Acta Biomaterialia**, 2023.
- SIONKOWSKA, A. Collagen blended with natural polymers: Recent advances and trends. **Progress in Polymer Science**, v. 122, p. 101452, 2021.
- SOWBHAGYA, R. et al. Collagen as the extracellular matrix biomaterials in the arena of medical sciences. **Tissue and Cell**, v. 90, p. 102497, 2024.
- STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clinica Chimica Acta**, v. 18, p. 267–273, 1967.
- SUN, B. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. **Cell Reports Physical Science**, v. 2, n. 8, p. 100515, 2021.
- SUURS, P. et al. Effects of broiler weight and strain on skin collagen characteristics and their applicability for co-extruded sausage casings. **Food Structure**, v. 35, p. 100305, 2023a.
- SUURS, P. et al. Evaluation of cattle skin collagen for producing co-extrusion sausage casing. **Food Hydrocolloids**, v. 140, p. 108595, 2023b.
- TANG, C. et al. Collagen and its derivatives: From structure and properties to their applications in food industry. **Food Hydrocolloids**, v. 131, p. 107748, 2022.
- TAWALBEH, D. et al. Techno-Functional and Bioactivity Properties of Collagen Hydrolysate and Peptide: A Review. **Food Reviews International**, v. 41, n. 4, p. 1–29, 2025.
- THEMELIS, T. et al. Quantitative amino acids profile of monofloral bee pollens by microwave hydrolysis and fluorimetric high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 173, p. 144–153, 2019.
- TONG, K. T. X. et al. Third-generation L-Lactic acid production by the microwave-assisted hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* extract. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125880, 2021.
- TONG, M. et al. Sources and types of collagens used in the cosmetic industry. **Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology**, v. 2, n. 1, p. 100068, 2025.
- URBIZO-REYES, U. et al. Physicochemical characteristics of chia seed (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates produced using ultrasonication followed by microwave-assisted hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 97, n. 105187, 2019.

- VARGAS, V. H. DE et al. Effect of OHMIC heating and ultrasound on functional properties of biodegradable gelatin-based films. **Polymer Engineering & Science**, v. 62, p. 1890–1906, 2022.
- WANG, F. et al. Rapid determination of furosine in milk using microwave-assisted HCl hydrolysis and ultra-performance liquid chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 11086–11093, 2020.
- WANG, P. Y. et al. A rapid and efficient method of microwave-assisted extraction and hydrolysis and automatic amino acid analyzer determination of 17 amino acids from mulberry leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 186, n. May, p. 115271, 2022.
- WANG, Y. et al. Collagen as a diversely structural biomaterial: From assembly strategies to potential applications in food industry. **Food Hydrocolloids**, v. 159, p. 110694, 2025.
- WEBER, P. Determination of amino acids in food and feed by microwave hydrolysis and UHPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1209, p. 123429, 2022.
- WEN, Q.; MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 280–291, 2020.
- WOJNOWSKI, W. et al. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 149, p. 116553, 2022.
- YAN, L. et al. Effects of Alkali and Acid on the Solubility and Molecular Weight of Collagen Hydrolysates Extracted from Bovine Hide. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 117, n. 10, 2022.
- YIN, M. et al. Rheological properties of xanthan-modified fish gelatin and its potential to replace mammalian gelatin in low-fat stirred yogurt. **LWT**, v. 147, p. 111643, 2021.
- YUSWAN, M. H. et al. Hydroxyproline determination for initial detection of halal-critical food ingredients (gelatin and collagen). **Food Chemistry**, v. 337, 2021.
- ZHANG, J. et al. Visualizing plant cell wall changes proves the superiority of hydrochloric acid over sulfuric acid catalyzed  $\gamma$ -valerolactone pretreatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 412, 2021.
- ZHANG, X.; YANG, L.; MESTER, Z. Determination of amino acids in selenium-enriched yeast by gas chromatography-mass spectrometry after microwave assisted hydrolysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 54–59, 2012.