



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR
DE ZONA PARA AVALIAÇÃO DA ORIGEM DE
AGLUTINANTES PROTEICOS DE USO ARTÍSTICO**

RAFAELA DA SILVA BARBOSA

Florianópolis
Julho/2022

Rafaela da Silva Barbosa

**ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR DE
ZONA PARA AVALIAÇÃO DA ORIGEM DE AGLUTINANTES
PROTEICOS DE USO ARTÍSTICO**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)



Documento assinado digitalmente

Luciano Vitali

Data: 01/08/2022 21:58:01-0300

CPF: 995.529.060-91

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Luciano Vitali

Me. Victor Rodrigues Alves

Dr. Thiago Guimarães Costa

Florianópolis
Julho/2022

AGRADECIMENTOS

Àquele que permitiu que eu chegasse até aqui. Senhor, muito obrigada.

Aos meus pais Joaquim e Arinê, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida, por não pouparem esforços para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade, por me abraçarem nos momentos difíceis. À minha Dani, parceira de jornadas literárias e cinematográficas, pelo companheirismo. Aos meus tios Tamil e Aildes, que desde muito cedo incentivaram minha fome pelo conhecimento através dos livros.

Ao meu companheiro de vida Jonny. Obrigada por sempre acreditar em mim, ter os melhores conselhos e conseguir arrancar sorrisos mesmo em meus dias mais sombrios. Você faz a jornada valer a pena.

Ao meu orientador Luciano Vitali, por me aceitar como aluna de IC no meu primeiro contato com a produção científica e continuar a me orientar neste trabalho. Obrigada pelas conversas e trocas científicas, por todas as risadas compartilhadas, por ter me ensinado tanto nos últimos anos e por apoiar a ideia do meu trabalho.

Ao Victor, meu coorientador que além de me ajudar também foi um grande amigo. Obrigada por compartilhar o seu projeto e permitir o surgimento do meu trabalho, por quebrar a cabeça comigo na interpretação de cada resultado, pela paciência em me ensinar e por cada texto motivacional antes de uma longa série de experimentos. Sem a sua ajuda esse trabalho não teria sido possível.

Ao meu coorientador Thiago, que me despertou para o ramo do patrimônio cultural e me mostrou que a área de atuação de um químico pode surpreender. Obrigada pela ideia principal desse trabalho, por estar me coorientando desde o TCC I e por me receber como estagiária no Atecor onde pude aprender muito mais sobre essa área sensacional! A toda equipe do Atecor que me acolheu, Celso, Marcelo e Karen, obrigada pelo apoio.

A todos os colegas e amigos do LabECC, que dedicaram um pouco do seu tempo a discutir dúvidas ou ter boas conversas regadas à café. Agradeço ao Allyson pelas diversas vezes que me ajudou a entender a teoria por trás da eletroforese capilar, e ao Prof. Micke pelos conselhos e pela empolgação a respeito do meu trabalho. Em especial quero agradecer à Riani que não mediu esforços ao

compartilhar do seu tempo no laboratório para discutir resultados ou para me dar aulas de estatística, e também por todas as conversas e reflexões sobre a vida que tivemos.

Às amigas que fiz durante a graduação: Bea, Fabi, Gabi e Layla. Juntamente com o Jonny vocês foram imprescindíveis durante todo o curso de Química, em momentos de provas, trabalhos e peripécias nos laboratórios de ensino. Vocês fizeram os momentos mais difíceis serem suportáveis.

Aos professores da graduação e do restante da minha vida acadêmica, por todos os ensinamentos compartilhados que me ajudaram a me tornar quem sou hoje.

À Fundação Catarinense de Cultura pelo bolsa de estágio concedida no Ateliê de Conservação e Restauração de Bens Culturais Móveis.

À Universidade Federal de Santa Catarina que me proporcionou um ensino gratuito e de qualidade.

À banca avaliadora pela disponibilidade de avaliar e contribuir com esse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Utilização de aglutinantes proteicos em bens do patrimônio cultural.....	16
2.2 Composição química dos aglutinantes proteicos.....	17
2.3 Eletroforese capilar.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1 Reagentes e soluções.....	25
4.2 Instrumentação.....	25
4.3 Softwares.....	26
4.4 Condições experimentais para análise de aminoácidos por eletroforese capilar de zona.....	26
4.5 Amostras.....	27
4.5.1 Origem das amostras e extração da caseína.....	27
4.5.2 Preparo das amostras por hidrólise das proteínas via ácido sulfúrico.....	27
4.6 Parâmetros analíticos de mérito.....	28
4.6.1 Conformidade do sistema.....	28
4.6.2 Seletividade.....	28

4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	28
4.6.4 Linearidade.....	29
4.6.5 Estudos de efeito de matriz.....	29
4.6.6 Precisão.....	30
4.6.7 Exatidão.....	30
4.7 Segurança no laboratório.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Separação dos aminoácidos por eletroforese capilar de zona.....	32
5.1.1 Composição do eletrólito de separação.....	32
5.1.2 Eletroferogramas experimentais e simulados e a seleção do padrão interno.....	37
5.2 Parâmetros analíticos de mérito.....	40
5.2.1 Conformidade do sistema.....	40
5.2.2 Seletividade.....	42
5.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	42
5.2.4 Linearidade.....	43
5.2.5 Estudos de efeito de matriz.....	44
5.2.6 Precisão.....	46
5.2.7 Exatidão.....	47
5.3 Análise das amostras.....	48
5.4 Comparação com outros métodos da literatura.....	51

6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE A. Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas de calibração com padronização interna.....	i
APÊNDICE B. Resultados do teste F para avaliação de ajuste do modelo linear e significância da regressão linear da curva de calibração com padronização interna para os analitos.....	ii
APÊNDICE C. Resultados do teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos das regressões das curvas de calibração com padronização interna para os analitos.....	ii
APÊNDICE D. Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas de adição de padrão.....	iii
APÊNDICE E. Resultados do teste F para avaliação de ajuste do modelo linear e significância da regressão linear da curva de calibração com adição de padrão para os analitos.....	iv
APÊNDICE F. Resultados do teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos das regressões das curvas de calibração com adição de padrão para os analitos.....	iv
APÊNDICE G. Resultados dos testes F e t de Student para comparação das inclinações das curvas com padronização interna e por adição de padrão para os analitos.....	v

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas dos principais aminoácidos presentes nos diferentes tipos de aglutinantes de origem animal.....19
- Figura 2.** Esquema de caracterização da superfície de um capilar de sílica fundida e representação da migração de espécies carregadas positivamente em direção ao cátodo, ilustrando o fluxo eletrosmótico catódico.....22
- Figura 3.** Gráfico de variação da mobilidade efetiva dos aminoácidos e componentes do BGE em função do pH (a) com faixa de pH variando de 0 a 14 e (b) com restrição a faixa de pH de 9,5 a 14.....33
- Figura 4.** Resultados da avaliação dos parâmetros do método de separação dos aminoácidos usando o *software Peakmaster*[®]. Condições experimentais usadas na simulação com o *Peakmaster*[®]: capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo × 75 µm diâmetro interno), detecção indireta, concentração de butilamina fixa em 180 mmol L⁻¹ e voltagem aplicada de 30 kV.....36
- Figura 5.** (a) Eletroferograma simulado com o *software Peakmaster*[®]; padrão interno e analitos em concentração média, mobilidade do EOF de 50 10⁻⁹ m⁻² V⁻¹ s⁻¹, capilar de 64,5 cm (56 cm efetivo), detecção indireta e direta, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 25 mmol L⁻¹ de His, voltagem aplicada de 30 kV e pH de 11,4. (b) Eletroferograma experimental dos analitos em temperatura de 20 °C com capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina, 25 mmol L⁻¹ de His, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4, padrão interno e analitos injetados na concentração de 25 mg L⁻¹. (c) eletroferograma usando as mesmas condições experimentais descritas, porém em temperatura de 12,5 °C com 10 mmol de β-CD no BGE. Legenda: 1 – HEPES, 2 – Pro, 3 – Hyp, 4 – Tyr, 5 – Ser, 6 – Gly.....38
- Figura 6.** (a) Eletroferograma dos analitos e aminoácidos interferentes em temperatura de 20 °C usando capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm

efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 25 mmol L⁻¹ de His, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4, padrão interno e analitos injetados na concentração de 25 mg L⁻¹ e (b) eletroferograma usando as mesmas condições experimentais descritas, porém em temperatura de 12,5 °C e com 10 mmol de β-CD no BGE. Legenda: 1 – Pro, 2 – Phe, 3 – HEPES, 4 – Leu, Ile e Val, 5 – Hyp, 6 – Met, 7 – Ala, 8 – Tyr, 9 – Thr, 10 – Asn, 11 – Ser, 12 – Gly.....39

Figura 7. Eletroferogramas das amostras sem padrão interno empregando o método validado. Capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina, 25 mmol L⁻¹ de His e 10 mmol de β-CD, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4 em temperatura de 12,5 °C, amostras de caseína e cola animal diluídas 10 vezes, amostra de gema de ovo sem diluição. Legenda: a – caseína, b – gema de ovo, c – cola animal, 1 – Pro, 2 – Hyp, 3 – Tyr, 4 – Ser, 5 – Gly.....49

Figura 8. Diagrama de exclusão para a identificação da origem dos aglutinantes proteicos.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual em massa de aminoácidos em aglutinantes de origem animal.....	18
Tabela 2. Mobilidades eletroforéticas dos aminoácidos estudados e dos componentes do eletrólito de corrida.....	34
Tabela 3. Coeficiente de variação de dez injeções consecutivas da solução contendo padrão interno e analitos.....	41
Tabela 4. Valores de LD e LQ obtidos através da relação sinal/ruído dos eletroferogramas das separações dos analitos.....	42
Tabela 5. Resultados da linearidade das curvas de calibração com padronização interna para os analitos.....	43
Tabela 6. Resultados da linearidade das curvas de calibração com adição de padrão para os analitos.....	44
Tabela 7. Valores de precisão instrumental, repetibilidade e precisão inter-ensaio avaliados em termos do CV para os analitos.....	46
Tabela 8. Valores de recuperação dos analitos obtidos em três níveis de concentração adicionados à matriz de cola animal com o desvio padrão de cada medida.....	47
Tabela 9. Resultados da quantificação dos analitos com o desvio padrão de cada resposta para amostras de cola animal, gema de ovo e caseína.....	49
Tabela 10. Comparação de características analíticas do método proposto por CZE e demais métodos descritos na literatura empregados para a análise de aminoácidos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala – Alanina

AOAC – *Association of Official Analytical Collaboration*

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido aspártico

BGE – *Background electrolyte*

CAPS – Ácido 3-(ciclo-hexilamino)-1-propanossulfônico

CE – *Capillary Electrophoresis*

CE-DAD – *Capillary Electrophoresis-Diode Array Detection*

CE-MS/MS – *Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry*

CHES – Ácido N-ciclo-hexil-2-aminoetanossulfônico

CV – Coeficiente de variação

Cys – Cistina

CZE – *Capillary Zone Electrophoresis*

DAD – *Diode Array Detection*

DOPA – Ácido(S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil) propanoico

EMD – *Electromigration dispersion*

EOF – *Electroosmotic flow*

GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico

Hyl – Hidroxilisina

Hyp – Hidroxiprolina

Ile – Isoleucina

LD – Limite de Detecção

Leu – Leucina

LQ – Limite de Quantificação

Lys – Lisina

Met – Metionina

MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MOPS - Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico

PCA – *Principal component analysis*

PES – Polietersulfona

Phe – Fenilalanina

Pro – Prolina

Ser – Serina

Thr – Treonina

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

UV-Vis – Ultravioleta-visível

Val – Valina

β -CD – β -Ciclodextrina

RESUMO

Os aglutinantes proteicos foram utilizados ao longo da história para a confecção de diversos objetos do patrimônio cultural e sua identificação fornece informações úteis para conservadores e restauradores. Dessa forma, o presente trabalho propõe a identificação da origem proteica dos aglutinantes através da determinação dos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina, serina e tirosina por eletroforese capilar de zona. O eletrólito de corrida utilizado foi constituído por 25 mmol L⁻¹ de histidina, 10 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina, em pH de 11,4. As separações foram conduzidas em capilar de sílica fundida, comprimento total de 64,5 cm (56,0 cm efetivo x 75 μ m diâmetro interno), em temperatura de 12,5 °C, com detecção indireta em 220 nm e direta em 240 nm. O método proposto foi validado segundo protocolos da EURACHEM e do INMETRO. Os resultados de conformidade indicaram que o sistema em análise foi adequado para ser validado. As respostas para os analitos foram lineares em uma faixa de 7,0 a 91,0 mg L⁻¹, os limites de detecção variaram entre 0,507 e 1,95 mg L⁻¹ e os limites de quantificação entre 1,69 e 6,51 mg L⁻¹. A repetibilidade e precisão inter-ensaio apresentaram, respectivamente, valores menores que 13,3% e 10,1% para a razão da área do sinal. A recuperação de três níveis de concentrações dos analitos adicionados em amostras de cola animal mostraram recuperações entre 91,3 e 121,3%. Os resultados indicaram que não houve efeito de matriz na quantificação dos aminoácidos, exceto para a tirosina. Assim, a quantificação dos aminoácidos sem efeito de matriz pôde ser realizada pelo método de padronização interna. Foram analisadas amostras dos aglutinantes cola animal, gema de ovo e caseína, as quais foram hidrolisadas com ácido sulfúrico seguido de neutralização e precipitação desse agente de hidrólise. O método proposto mostrou resultados significantes para os parâmetros de validação, indicando potencial para ser empregado em análises de amostras oriundas do patrimônio cultural.

Palavras-chave: eletroforese capilar de zona, aminoácidos, aglutinantes proteicos, patrimônio cultural.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de bens culturais materiais, como obras de arte, permite a obtenção de informações importantes acerca do objeto para sua caracterização, preservação e restauro. Aglutinantes proteicos como a cola animal, a caseína e a gema de ovo, foram usados amplamente para o preparo de bases de pintura, tintas e adesivos utilizados em obras de arte. Através da análise desses aglutinantes, diversos aspectos da obra podem ser elucidados permitindo a avaliação do trabalho do artista, o mapeamento de técnicas de pintura e preparo de materiais desenvolvidos, bem como a investigação de possíveis falsificações.

No processo de envelhecimento dos bens culturais as proteínas presentes nestes materiais podem sofrer processos de degradação que dificultam a sua identificação direta, mas sua composição básica de aminoácidos permanece a mesma. Com isso, os aglutinantes podem ser diferenciados entre si com base na análise do teor de seus aminoácidos, de modo que um método capaz de os determinar configura uma ferramenta analítica de interesse para essa área.

Diversas técnicas são utilizadas para a análise de aminoácidos em bens culturais, muitas das quais possuem baixa frequência analítica, empregam sistemas de detecção de alto custo, necessitam de grandes volumes de solvente e de um preparo de amostra laborioso contemplando etapa mandatória de derivatização. A técnica de eletroforese capilar surge como uma alternativa atrativa, por requerer baixo volume de solvente e quantidades pequenas de amostra, apresentando vantagem na análise de bens culturais, cuja disponibilidade é limitada.

Além disto, a versatilidade da modalidade de separação de eletroforese capilar de zona empregando um detector de arranjo de diodos possibilita a determinação de aminoácidos no modo de detecção direta, para os cromóforos, e indireta, para os não cromóforos, pela seleção adequada dos componentes do eletrólito de corrida. Dentre as vantagens do detector pode-se incluir sua ampla utilização, baixo custo de manutenção e detectabilidade geralmente na ordem de mg L^{-1} .

Recentemente, no Laboratório de Eletroforese Capilar e Cromatografia (LabECC) da UFSC, foi desenvolvido um método de eletroforese capilar de zona com

detecção indireta, voltado para determinar colágeno total pela quantificação de hidroxiprolina (Hyp) em amostras de produtos cárneos e suplementos. A simultânea precipitação e neutralização dos componentes usados na reação de hidrólise permitiu adequar as amostras para a análise pretendida. Embora utilizado para determinar apenas um aminoácido, este método demonstrou capacidade promissora de separar outros aminoácidos em amostras distintas.

Diante do apresentado, pretende-se adequar o método previamente desenvolvido para avaliar os aminoácidos relevantes na identificação de diferentes aglutinantes proteicos de uso artístico encontrados em amostras de bens culturais. Para isto, o presente trabalho visa ajustar a separação de um conjunto de aminoácidos característicos dos aglutinantes, validar e aplicar o método para determinação dos aminoácidos em amostras de cola animal, gema de ovo e caseína.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Utilização de aglutinantes proteicos em bens do patrimônio cultural

As proteínas estão presentes em diversos materiais de origem animal utilizados em bens culturais, como manuscritos, pinturas e esculturas¹. As colas de origem animal são uma classe importante de aglutinantes encontrados em alguns desses objetos, constituídas de colágeno oriundo de mamíferos ou peixes². Outros aglutinantes de origem animal, como o ovo e a coalhada do leite, também foram amplamente utilizados por vários artistas ao longo da história em conjunto com a cola animal^{2,3}.

Esses aglutinantes eram aplicados na preparação de tintas, atuando como dispersores de pigmentos visando sua adesão e coesão na superfície de pintura⁴. Para isso os aglutinantes eram utilizados em sua forma pura ou misturados entre si e a óleos secativos. Além dessa finalidade, a cola animal foi extensivamente utilizada para preparar as superfícies de telas e madeira para receber a camada pictórica, através de sua utilização sozinha ou combinada a pigmentos brancos e gesso, além de também ter sido empregada como adesivo para douramento de objetos^{5, 6}.

A identificação de aglutinantes permite a obtenção de diversas informações de interesse histórico e artístico. Seu estudo pode auxiliar na compreensão de hábitos humanos em períodos remotos, como a descoberta da utilização de leite no preparo de tintas datadas de aproximadamente 49 mil anos, muito antes do início da domesticação do gado⁷. A identificação da origem do aglutinante também possibilita a obtenção de dados relevantes sobre os bens artísticos para trabalhadores da área de conservação e restauro, como as técnicas de pintura utilizadas pelo artista, a autenticidade da obra, a presença de um processo de restauração prévio no trabalho e a avaliação do método mais adequado para sua conservação^{3, 8 - 11}. Para efetuar a identificação dos aglutinantes citados é imprescindível conhecer sua composição química.

2.2 Composição química dos aglutinantes proteicos

As proteínas são cadeias poliméricas de aminoácidos sintetizadas a partir de vinte monômeros distintos. São as macromoléculas mais abundantes e funcionalmente diversificadas da natureza, permitindo a ocorrência da maioria dos processos fisiológicos de um organismo¹². Elas se formam pela junção de aminoácidos através de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas e suas estruturas podem ser hidrolisadas em seus aminoácidos constituintes.

Os aminoácidos comuns são α -aminoácidos, apresentando um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo carbono (carbono α). Eles se distinguem entre si conforme suas cadeias laterais, que podem variar em sua estrutura e influenciam diretamente na solubilidade do composto¹². Exceto a glicina (Gly), os demais aminoácidos comuns possuem quatro grupos diferentes ligados ao carbono α , caracterizando assim um centro quiral e sendo opticamente ativos, com a presença de dois estereoisômeros cada.

As composições dos aglutinantes de origem animal são distintas entre si. A cola animal é feita à base de tecidos conjuntivos de mamíferos e peixes, sendo majoritariamente constituída por colágeno, e pode ser encontrada com a especificação do animal de origem ou como uma mistura de origem diversificada¹³. A coalhada do leite, obtida por meio da acidificação do leite desnatado, é constituída principalmente por caseína. Enquanto que esses dois aglutinantes são definidos pela presença abundante de uma única proteína, o ovo, seja gema ou clara, dispõe de uma constituição proteica variada^{9, 13}.

A clara do ovo possui cerca de metade da sua composição proteica constituída de ovalbumina, sendo o restante conalbumina e lisozima, e a gema é composta por fosfovitina, α e β -lipovitelinas e α , β e γ -livetinas¹³. Apesar de possuírem proteínas distintas, a clara e a gema não apresentam diferenças qualitativas em relação aos aminoácidos, apenas pequenas diferenças quantitativas^{1, 13}. O percentual dos aminoácidos encontrados nos aglutinantes de origem animal pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual em massa de aminoácidos em aglutinantes de origem animal.

Aminoácido	Cola animal	Gema de ovo	Caseína
Glicina (Gly)	26,0 - 27,4	3,5 - 4,9	1,7 - 3,8
Alanina (Ala)	10,3 - 13,8	5,6 - 8,0	2,7 - 4,4
Valina (Val)	2,5 - 4,2	6,4 - 8,6	7,2 - 9,6
Leucina (Leu)	3,7 - 5,5	9,2 - 13,8	9,0 - 11,5
Isoleucina (Ile)	1,9 - 3,0	5,1 - 7,8	6,0 - 7,7
Prolina (Pro)	11,9 - 14,4	4,5 - 6,5	9 - 19,2
Fenilalanina (Phe)	2,3 - 2,9	3,9 - 6,7	5,1 - 5,6
Tirosina (Tyr)	1,0	2,8 - 4,5	4,6 - 5,5
Triptofano (Trp)	0	1,8 - 2,2	0
Serina (Ser)	3,5 - 4,3	9,1 - 13,4	3,0 - 4,6
Treonina (Thr)	2,3	5,6 - 8,6	2,7
Cistina (Cys)	0	1,6 - 1,9	0
Metionina (Met)	0,9 - 1,1	2,3 - 3,7	2,3 - 2,7
Arginina (Arg)	8,2	5,5 - 11,4	4,0
Histidina (His)	0,7	2,4 - 4,0	3,6
Lisina (Lys)	3,5 - 4,0	5,7 - 12,6	5,3 - 6,7
Ácido aspártico (Asp)	5,6 - 6,9	11,5 - 15,5	6,1 - 9,2
Ácido glutâmico (Glu)	10,2 - 11,1	15,0 - 20,2	20,2 - 29,6
Hidroxiprolina (Hyp)	12,8 - 13,5	0	0
Hidroxilisina (Hyl)	1,2	0	0

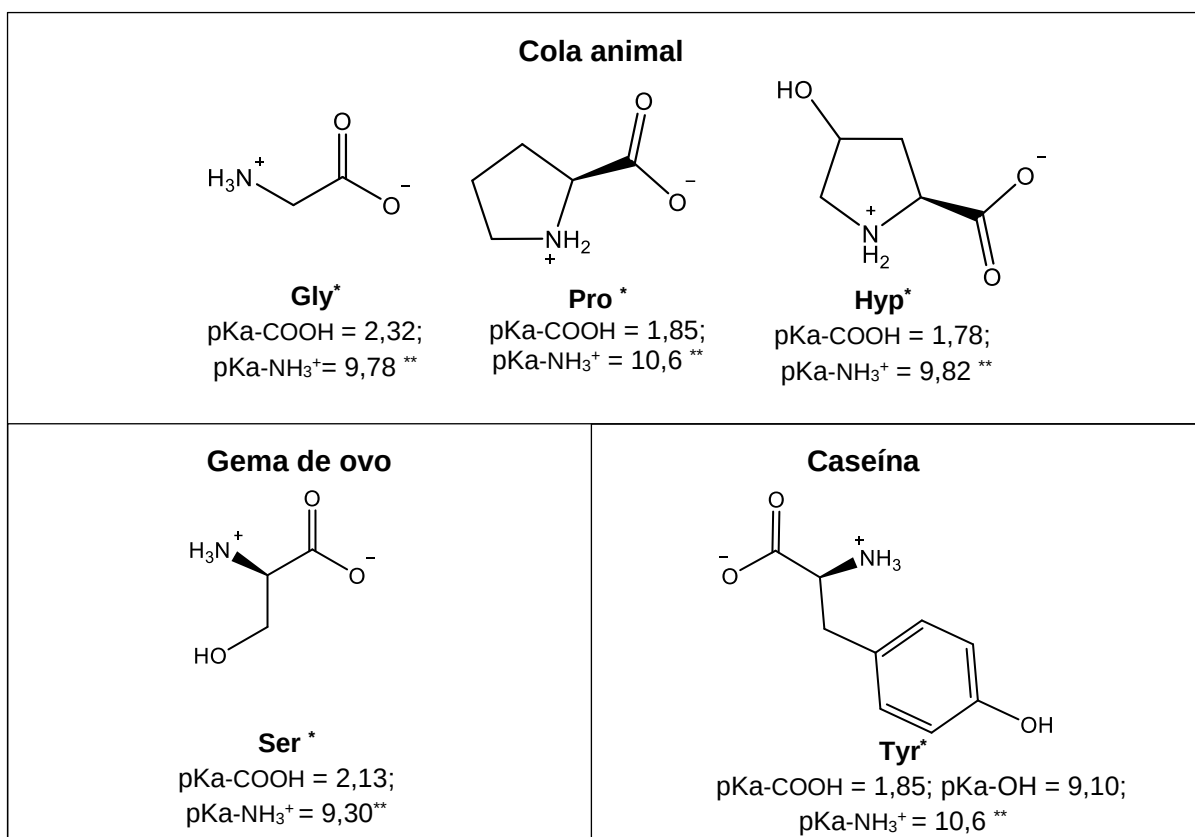
Fonte: adaptado de Stuart (2007); Colombini, et al (2000); Fico, et al (2018); Attia, et al (2020); Evans, et al (1949)^{1, 14 - 16, 25}.

De acordo com os dados da Tabela 1, destacam-se alguns aminoácidos que podem ser considerados marcadores de determinada proteína devido ao seu valor percentual ou devido a estarem presentes em um único tipo de aglutinante. No decorrer do envelhecimento de bens culturais, as proteínas podem passar por processos de degradação, como a hidrólise parcial das cadeias polipeptídicas, dificultando assim sua identificação direta¹⁶. Apesar disso, sua composição básica de aminoácidos é mantida¹⁷. Assim, a identificação dos aglutinantes pode ser feita com base na análise dos aminoácidos oriundos de um preparo de amostras empregando reação de hidrólise das proteínas contidas nas amostras^{3,8, 18-20}.

Alguns aminoácidos possuem abundância elevada na proteína, ou são ausentes, de modo que facilitam a diferenciação dos aglutinantes. O colágeno se

caracteriza por altos valores de Gly, Hyp e Pro, enquanto que as outras proteínas não apresentam Hyp em sua constituição. A gema de ovo apresenta a maior porcentagem de Ser e a menor porcentagem de Pro. A caseína possui a maior porcentagem de Tyr, além de apresentar a menor porcentagem de Gly. Portanto, esses aminoácidos podem ser utilizados como marcadores para diferenciar a origem proteica dos aglutinantes. As estruturas desses aminoácidos se encontram ilustradas na Figura 1.

Figura 1. Estruturas dos principais aminoácidos presentes nos diferentes tipos de aglutinantes de origem animal.



Fonte: *adaptado de Nelson (2014)¹² e PubChem²¹, estruturas representadas com a ionização predominante em pH 7,0; **software Peakmaster^{®22}.

Em virtude da presença de hidrogênios dissociáveis relacionados aos valores de pKa dos grupamentos carboxila (-COOH) e amina (-NH₃⁺) apresentados na Figura 1, pode ser observada a predominância de carga positiva, negativa ou ausência de carga conforme o valor de pH do meio¹². Devido a este comportamento, os

aminoácidos podem ser separados em suas formas positivas ou negativas por meio de técnicas que exploram a mobilidade iônica.

Para ter acesso aos aminoácidos em amostras proteicas, diferentes reações de hidrólise podem ser realizadas, incluindo hidrólise ácida, básica ou enzimática²³. Alguns aminoácidos são suscetíveis à decomposição dependendo da hidrólise empregada. No caso dos aminoácidos apresentados na Figura 1, a hidrólise ácida pode ser utilizada sem problemas de degradação durante o processo de preparo de amostras.

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para determinar aminoácidos em obras de arte, como cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a espectrometria de massas^{10, 24-29}, cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama³⁰, espectroscopia Raman^{11, 31}, espectroscopia de absorção no infravermelho médio³², espectroscopia de refletância na região do infravermelho próximo³³, por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima^{34, 35, 36} e eletroforese capilar^{8, 19, 20, 37}. Os métodos mais utilizados nesse campo de estudo são os cromatográficos, conhecidos por requisitarem o uso de grandes volumes de solvente e demandarem um tempo maior de análise. Algumas metodologias ainda necessitam de um preparo de amostra complexo, pois os aminoácidos precisam passar por um processo de derivatização para serem analisados.

A análise de aminoácidos em obras de arte envolve amostras de origens distintas, disponíveis em pequenas quantidades e de constituição complexa, com a necessidade de um resultado rápido e preciso para otimizar procedimentos de restauração, conservação e periciais. Assim, é necessária uma análise que demande pouca amostra, seja passível de aplicação em amostras de constituições distintas, com uma frequência analítica adequada e uma detecção sensível e seletiva capaz de detectar e quantificar os aminoácidos em uma mesma análise. Isto posto, a eletroforese capilar se mostra como uma técnica analítica de interesse para o desenvolvimento de novos métodos para a determinação de aminoácidos.

2.3 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) é uma técnica que opera pela separação de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis de forma rápida e eficiente. A técnica exige pequenas quantidades da amostra, com volumes de injeção na ordem de nanolitros, e demanda de mililitros de solução contendo o eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*) empregado na análise³⁸. Além de possuir uma instrumentação simples e um baixo consumo de reagentes e amostras, a CE chama atenção devido ao baixo custo operacional³⁹.

A CE comumente utiliza um capilar de sílica fundida e possui diversos modos de separação³⁹. Um dos modos mais utilizados devido a sua simplicidade e eficiência é a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*), caracterizada por ser uma técnica na qual a amostra é disposta como uma banda de espessura pequena introduzida no meio tamponado do capilar⁴⁰. Para este modo de separação existe a possibilidade de utilizar um *software* de simulação para orientar o desenvolvimento do método.

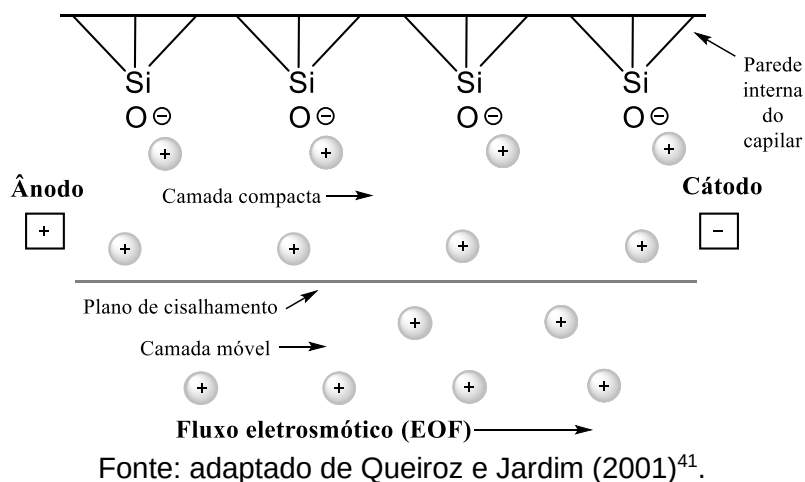
Essa ferramenta chama-se *Peakmaster*[®], cuja programação permite prever o comportamento dos analitos e do BGE usados em CZE, apresentando um eletroferograma simulado dos resultados²². O *software* fornece informações sobre os parâmetros presentes no sistema de separação, como força iônica, pH e capacidade tamponante, além de dados sobre o sinal de resposta para diferentes modos de detecção e a tendência de um soluto apresentar alta dispersão por eletromigração (EMD, do inglês *electromigration dispersion*), causando deformação de sinal. O *software* ainda conta com um banco de dados de moléculas que permite a redução do número de experimentos necessários para o desenvolvimento do método e do consumo de reagentes, o que configura outra vantagem à técnica.

Um fenômeno importante que ocorre na separação em CE é a formação de um fluxo de solução no interior do capilar devido a aplicação de voltagem³⁹. O chamado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) varia conforme o valor de pH do meio e da natureza da superfície do capilar utilizado. Os capilares normalmente utilizados em CE são feitos de sílica fundida. Sua parede apresenta grupos silanóis (SiOH) passíveis de serem ionizados quando em contato com

soluções de pH em torno de seu pK_a (5,9), atingindo carga negativa (SiO^-) e permitindo a formação de uma camada de contra íons próxima à parede do capilar (H^+)⁴³.

Assim, a dupla camada elétrica formada cria uma diferença de potencial próxima à parede do capilar, gerando um potencial zeta⁴¹. A aplicação de uma diferença de potencial no meio faz com que os cátions solvatados com água migrem em direção ao cátodo, gerando um EOF catódico como ilustrado pela Figura 2³⁹.

Figura 2. Esquema de caracterização da superfície de um capilar de sílica fundida e representação da migração de espécies carregadas positivamente em direção ao cátodo, ilustrando o fluxo eletrosmótico catódico.



O EOF é altamente dependente do pH do eletrólito devido ao potencial zeta ser governado pela ionização dos grupos silanóis da parede do capilar⁴². O potencial zeta que é gerado permeia todo o comprimento do capilar e produz assim uma velocidade de fluxo uniforme sem gerar pressão.

Com o pH em valores acima de 9 os silanóis ficam completamente ionizados, produzindo um EOF de alta mobilidade. Com a velocidade eletrosmótica de grande magnitude, o EOF é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector permitindo assim a análise simultânea de compostos distintamente carregados⁴³. Para analitos aniônicos, em um capilar normal a migração ocorre de forma contra-eletoosmótica, de modo que os analitos são conduzidos pelo EOF até o detector.

O instrumento de CE pode possuir diversos sistemas de detecção, sendo muito comum a utilização de fotodetectores baseados na detecção por absorção na

região do ultravioleta-visível (UV-Vis)⁴³. O equipamento portando um detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detection*) permite a análise dos sinais dos analitos em diversos comprimentos de onda, de forma direta ou indireta. Na análise direta, analitos cromóforos produzem sinais ao passarem pela janela de detecção do instrumento conforme sua capacidade de absorção da radiação no comprimento de onda analisado. Na análise indireta, um composto cromóforo é utilizado no BGE e o analito desloca-o fisicamente ao passar pela janela de detecção, produzindo um sinal proporcional a sua concentração no meio⁴⁴. Uma grande vantagem da detecção indireta é permitir a determinação de analitos não cromóforos sem necessidade de um processo de derivatização, simplificando sua análise e processos de preparo de amostra.

Apesar das vantagens discutidas sobre a técnica de CE, poucos trabalhos foram publicados demonstrando métodos de análise de aminoácidos em bens culturais^{8, 19, 20, 37}. As metodologias apresentadas pela literatura descrevem a utilização da CE com detecção por condutividade ou espectrometria de massa para a determinação de diferentes aglutinantes proteicos, demonstrando uma lacuna na literatura para metodologias alternativas por CE utilizando um sistema de detecção mais difundido e aplicando-o a análise de patrimônio cultural. Apesar disso, podem ser encontrados na literatura diversos métodos para a análise de aminoácidos por CE em amostras de alimentos e matrizes biológicas⁴⁵⁻⁴⁸.

Uma metodologia desenvolvida pelo doutorando Victor Rodrigues Alves, do grupo de pesquisa do Laboratório de Eletroforese Capilar e Cromatografia (LabECC), para determinação de colágeno total pela quantificação de Hyp em amostras de produtos cárneos e suplementos via CZE com detecção UV indireta, se apresentou promissora para a separação dos objetos de estudo do presente trabalho. O método demonstrou seletividade adequada para grande parte dos vinte aminoácidos avaliados como interferentes, sugerindo a possibilidade de análise desses aminoácidos. Desta maneira, este trabalho tem como propósito atestar, por validação analítica, a ampliação do escopo do método citado, a fim de determinar Pro, Hyp, Tyr, Ser e Gly em aglutinantes de origem animal utilizados em patrimônio artístico, visando a obtenção de informações acerca de sua origem proteica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Implementar e validar um método analítico por eletroforese capilar de zona para determinação de aminoácidos em aglutinantes de origem animal utilizados na elaboração de obras de arte.

3.2 Objetivos específicos

- Empregar o *software Peakmaster*® na avaliação da aplicabilidade do método para a análise dos aminoácidos alvo: Gly, Pro, Hyp, Ser e Tyr;
- Selecionar um padrão interno adequado para a análise das amostras utilizando a base de dados de compostos do *software Peakmaster*®;
- Avaliar os parâmetros de mérito do método proposto incluindo linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito de matriz, exatidão e precisão; implementar o método de preparo de amostras por hidrólise ácida empregando ácido sulfúrico;
- Aplicar o método proposto para a análise de aminoácidos em amostras de cola animal, gema de ovo e caseína;
- Comparar as características do método proposto com outros métodos descritos na literatura.

4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes e soluções

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico. No preparo das soluções foi utilizada água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), com resistividade de 18,2 M Ω cm. Os padrões de aminoácidos explorados no método (Gly, Pro, Hyp, Ser e Tyr) foram provenientes da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). As soluções estoque de cada aminoácido foram preparadas em concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas em geladeira.

Os componentes do BGE utilizados foram His, β -ciclodextrina (β -CD) e butilamina, todos da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Os compostos ácido N-ciclo-hexil-2-aminoetanossulfônico (CHES), ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico (MOPS), ácido 3-(ciclo-hexilamino)-1-propanossulfônico (CAPS), ácido(S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil) propanoico (DOPA) e ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES), todos da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), foram testados na seleção do padrão interno para a análise de aminoácidos.

Para o ensaio de seletividade foram utilizados os aminoácidos Ala, Asn, Phe, Ile, Leu, Met, Thr e Val, todos provenientes da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Na extração da caseína foram utilizados etanol da marca Dinâmica (Jaraguá do Sul, SC, Brasil), éter etílico e ácido acético glacial P. A. da marca Synth (Diadema, SP, Brasil). Para a hidrólise das amostras foi utilizado ácido sulfúrico da marca Vetec (São Paulo, SP, Brasil). A neutralização dos hidrolisados foi feita utilizando carbonato de estrôncio da marca Dinâmica (Jaraguá do Sul, SC, Brasil). Para o condicionamento dos capilares de sílica foi utilizado solução de NaOH 1 mol L⁻¹ fornecida pela Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

4.2 Instrumentação

A realização das separações eletroforéticas foi efetuada utilizando o equipamento de CE modelo Agilent Technologies CE 7100 (Palo Alto, CA, USA) equipado com DAD e controlado pelo software *ChemStation*[®], disponível no

laboratório de eletroforese capilar do Departamento de Química da UFSC. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Hanna Instruments, modelo HI1330B (Barueri, SP, Brasil), com eletrodo de referência de Ag/AgCl. Para o preparo de amostras foi utilizado estufa da marca De Leo, modelo DL SE 42 L. As amostras hidrolisadas foram centrifugadas em Centrífuga Eppendorf MiniSpin Plus, (Hamburgo, HA, Alemanha).

4.3 Softwares

O software *Peakmaster*[®] versão 5.3 foi utilizado como ferramenta no desenvolvimento do método para separação dos aminoácidos por CZE. Para o tratamento dos dados foram empregados os softwares *ChemStation*[®], *GraphPad Prism*[®] 5, *Microsoft Excel*[®] 2016 e *PAST*[®] versão 4.03.

4.4 Condições experimentais para análise de aminoácidos por eletroforese capilar de zona

As separações foram realizadas em temperatura controlada de 12,5 °C utilizando um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliamida, comprimento total de 64,5 cm, efetivo de 56 cm e diâmetro interno de 75 µm, provenientes da empresa Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA). Em seu primeiro uso, o capilar foi condicionado com 30 min de NaOH 1 mol L⁻¹, 30 min de água e 15 min de BGE. Entre as injeções o capilar foi lavado com BGE por 120 s.

Para as análises, o BGE foi composto por 25 mmol L⁻¹ de His, 10 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina, em pH de 11,4 (± 0,05), preparado diariamente antes das análises. O BGE foi submetido a banho ultrassônico por 8 min e percolado em filtros de seringa de polietersulfona (PES), com poros de 0,22 µm, da marca Kasvi. As condições de separação utilizadas incluem voltagem de 30 kV com polaridade positiva na extremidade de injeção, modo de detecção indireto no UV em 220 nm e detecção direta no UV em 240 nm, e injeção hidrodinâmica das amostras com pressão de 50 mbar durante 15 s.

4.5 Amostras

4.5.1 Origem das amostras e extração da caseína

As amostras de cola animal e gema de ovo foram obtidas no comércio local. A caseína utilizada no trabalho foi obtida utilizando o método adaptado de Patini, Tripathi e Bosmia (2013)⁴⁹ em amostras de leite desnatado, obtido no comércio local. Foram adicionados 200 mL de leite desnatado e 100 mL de água deionizada em um béquer sob agitação magnética. A acidificação do leite foi efetuada de forma lenta com 2,5 mL de ácido acético glacial, sob agitação, até que o sistema atingisse pH de 4,6. A caseína precipitada foi decantada e posteriormente submetida a filtração. Em seguida, a caseína foi lavada com etanol 50% (v/v) e éter etílico, seguida de nova filtração simples. O sólido obtido foi seco em estufa a 40 ($\pm$ 5) °C por 48 horas. Por fim, a caseína foi macerada em almofariz com pistilo para obtenção de um pó finamente dividido.

4.5.2 Preparo das amostras por hidrólise das proteínas via ácido sulfúrico

As amostras foram hidrolisadas conforme procedimento adaptado da AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Collaboration*, método AOAC 990.26⁵⁰. Quantidades de 0,500 $\pm$ 0,01 g dos aglutinantes foram transferidos diretamente para tubos de hidrólise com tampas. Foi adicionado um volume de 3,75 mL de ácido sulfúrico 3,5 mol L⁻¹, cuidadosamente agitado e submetido a 105,0 $\pm$ 1,0 °C por 16 h. Os hidrolisados de amostra foram resfriados à temperatura ambiente, filtrados e completados com água até 5 mL em frascos volumétricos.

Um volume de 200 μ L de alíquotas de hidrolisados de aglutinantes foram transferidos para eppendorfs de 2 mL, contendo 105 mg de carbonato de estrôncio necessário à neutralização e precipitação dos componentes utilizados na hidrólise. As suspensões foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi reservado para análise no sistema CE.

4.6 Parâmetros analíticos de mérito

Os protocolos de validação de métodos analíticos que foram seguidos para análise de aglutinantes no trabalho foram os disponibilizados pela EURACHEM⁵¹ e pelo INMETRO⁵². Foram examinados parâmetros analíticos como conformidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação, linearidade, seletividade, efeito de matriz, exatidão e precisão.

4.6.1 Conformidade do sistema

Para a análise da conformidade do sistema foram realizadas dez injeções consecutivas de uma mesma solução padrão dos aminoácidos e padrão interno, ambos em concentração de 25,0 mg L⁻¹. O parâmetro avaliado foi o coeficiente de variação (CV), calculado usando os resultados de razão do sinal de cada analito pelo sinal do padrão interno. Ainda, foi avaliada a conformidade do sistema com a presença de frascos contendo o BGE de 0,75 mL e 1,5 mL no equipamento de CE.

4.6.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada com o auxílio do *software Peakmaster*[®] considerando os aminoácidos como interferentes principais. Esta foi seguida pela conferência experimental analisando os analitos em conjunto com os aminoácidos interferentes, adicionando individualmente soluções padrão de cada aminoácido para sua identificação no eletroferograma. Estes resultados foram comparados com eletroferogramas preliminares das amostras reais de aglutinantes⁵².

4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) do método foi estabelecido através da relação de três vezes a razão sinal ruído e o limite de quantificação (LQ) foi estabelecido através da relação de dez vezes a razão sinal ruído⁵². Os valores foram calculados através da média obtida de triplicatas de injeção dos analitos e padrão interno, ambos em concentração de 25,0 mg L⁻¹.

4.6.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada por curvas de calibração aquosas com padronização interna construídas em triplicata, possuindo seis níveis distribuídos em concentrações crescentes dos analitos dentro da faixa de 7,0 mg L⁻¹ a 91,0 mg L⁻¹ e mantendo a concentração do padrão interno constante em 25,0 mg L⁻¹. A linearidade foi reportada pelo coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Foi avaliada a presença de valores anômalos pelo gráfico de resíduos e a possibilidade de sua exclusão foi considerada pelo teste de Grubbs calculado pela Equação 1.

$$G = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s} \quad (\text{Equação 1})$$

Legenda: $\bar{x}$ - média das replicatas; x_i - replicata suspeita de ser o ponto discrepante; s - desvio padrão das replicatas. Fonte: adaptado de Grubbs (1969)⁵³.

A avaliação de ajuste do modelo linear e a significância da regressão linear foi efetuada pelo teste F ($\alpha = 0,05$) através da utilização das Equações 2 e 3, respectivamente.

$$F = \frac{MQfa}{MQep} \quad (\text{Equação 2})$$

$$F = \frac{MQR}{MQR} \quad (\text{Equação 3})$$

Legenda: $MQfa$ - média quadrada da falta de ajuste; $MQep$ - média quadrada do erro puro; MQR - média quadrada da regressão; MQR - média quadrada do resíduo. Fonte: adaptado Bruns, Scarminio e Neto (2006)⁵⁴.

Por fim, foi verificada a premissa de normalidade com o teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$)⁵⁵.

4.6.5 Estudos de efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração com padronização interna e as curvas de adição de padrão para a matriz de cola animal, ambas em triplicata e na

faixa de trabalho supracitada, com padrão interno em concentração constante de 25,0 mg L⁻¹. O efeito de matriz foi avaliado estatisticamente pelo teste F e pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$)⁵⁶.

4.6.6 Precisão

A precisão foi determinada em termos da precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. A precisão instrumental foi avaliada preparando uma solução padrão em concentração de 49,0 mg L⁻¹ e injetada nove vezes. Para o cálculo da repetibilidade foram preparadas três replicatas reais de soluções dos padrões em três níveis de concentração da calibração externa distribuídos dentro da faixa linear (7,0 mg L⁻¹, 49,0 mg L⁻¹ e 91,0 mg L⁻¹) e analisados no mesmo dia. A precisão intermediária foi verificada pela análise de três replicatas de solução padrão nos mesmos três níveis de concentração mencionados, sendo injetados em três dias diferentes. Os resultados foram expressos em termos do CV para a razão de área e tempo de migração⁵¹.

4.6.7 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação. Foram realizadas adições de soluções padrão dos analitos na amostra de cola animal em três níveis de concentração distribuídos dentro da faixa linear (21,0 mg L⁻¹, 63,0 mg L⁻¹ e 91,0 mg L⁻¹), com três réplicas autênticas de cada nível⁵¹. A recuperação foi calculada com a Equação 4.

$$REC(\%) = \frac{C_{amostra\ fortificada} - C_{amostra\ não\ fortificada}}{C_{adicionada}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Fonte: adaptado de Magnusson e Örnemark (2014)⁵¹.

4.7 Segurança no laboratório

O retorno presencial ao laboratório de pesquisa foi feito com o cumprimento de práticas de biossegurança para evitar o contágio de COVID-19, como o distanciamento social e a utilização de máscara nos ambientes da UFSC. Durante todos os procedimentos no laboratório foram utilizados equipamentos de proteção individual como jaleco, luvas e óculos de proteção. Boas práticas de vestimenta foram

necessárias para o andamento seguro dos experimentos, como uso de sapatos fechados e calças longas. As soluções foram preparadas em capela com exaustor ligado para evitar contaminações e intoxicação por parte do aluno.

Os resíduos produzidos foram descartados em recipientes inertes específicos para a coleta de soluções aquosas e soluções orgânicas, e os materiais descartáveis contaminados como ponteiros, luvas, micro frascos e capilares quebrados foram alocados em recipientes particulares. Ambos foram armazenados até a coleta por empresa responsável pelo descarte dos resíduos da UFSC. Soluções de pH ácido ou básico foram neutralizadas previamente antes do descarte.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Separação dos aminoácidos por eletroforese capilar de zona

5.1.1 Composição do eletrólito de separação

Para confirmar que as condições do método desenvolvido pelo doutorando Victor Rodrigues Alves podem separar adequadamente os aminoácidos alvo do presente trabalho, as condições foram reproduzidas em simulações utilizando o *software Peakmaster*[®]. Foi preciso identificar se a região de pH do método permite que os analitos apresentem mobilidades distintas entre si para que possam ser separados em uma análise sem interferências advindas da comigração. A fim de determinar a faixa de pH em que os aminoácidos possuem a maior diferença de mobilidade para gerar o melhor perfil de separação foram construídas curvas de mobilidade efetiva versus pH. Os cálculos de mobilidade efetiva foram realizados utilizando as Equações 5 e 6.

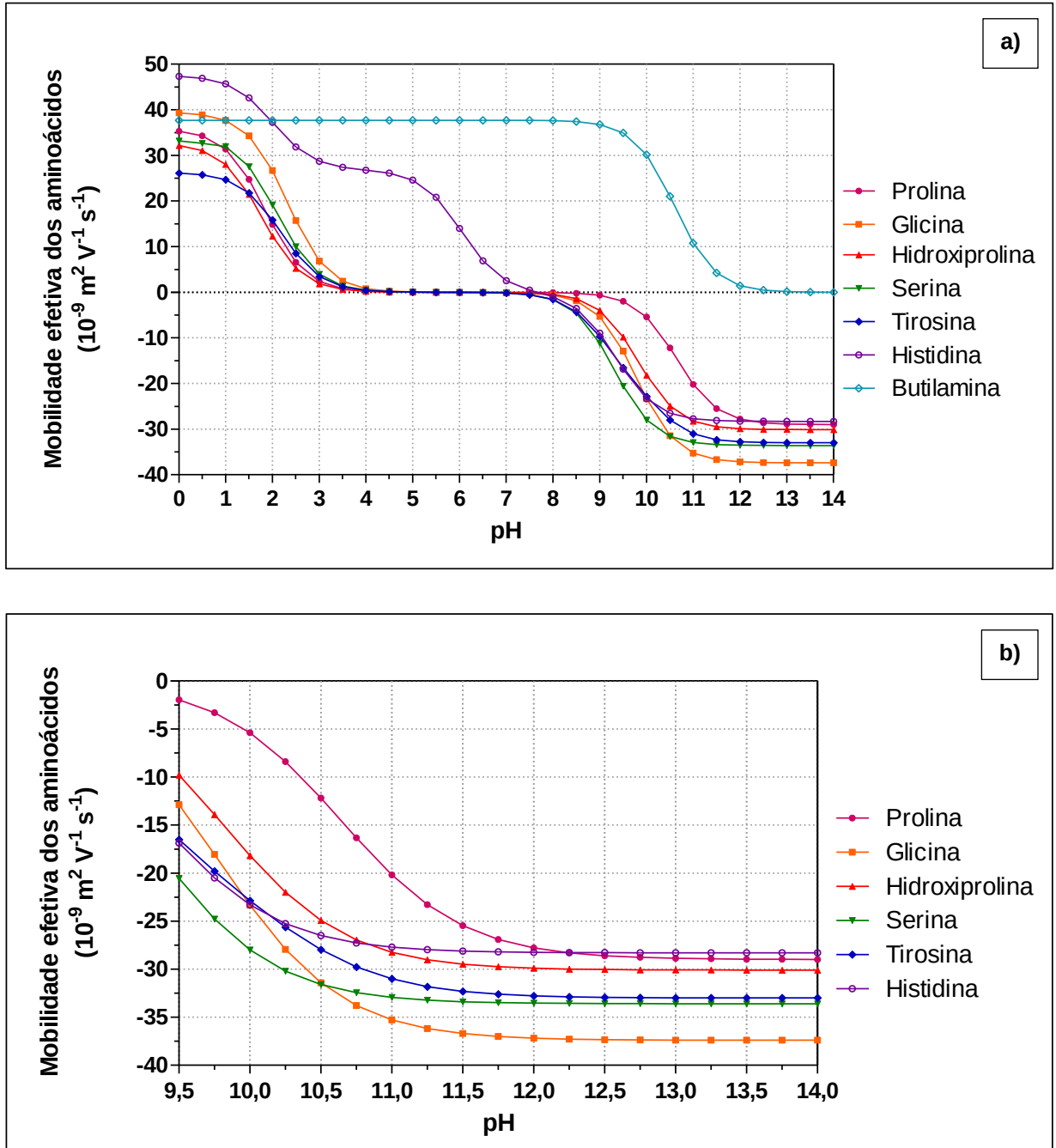
$$\mu_{eff}, A^+ = \frac{\mu_o, A^+}{1 + 10^{(pH - pka)}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\mu_{eff}, A^- = \frac{\mu_o, A^-}{1 + 10^{(pka - pH)}} \quad (\text{Equação 6})$$

Fonte: adaptado de Poole (2003)⁵⁷.

A μ_{eff} representa a mobilidade efetiva e a μ_o a mobilidade eletroforética do analito. A μ_{eff} está relacionada ao equilíbrio iônico das espécies e, como conseguinte, ao seu grau de ionização adquirido em determinado pH. Os valores de mobilidade eletroforética para os analitos e os componentes do BGE foram retirados do banco de dados do *software Peakmaster*[®] e se encontram listados na Tabela 2. A relação gráfica entre μ_{eff} em diferentes valores de pH encontra-se na Figura 3.

Figura 3. Gráfico de variação da mobilidade efetiva dos aminoácidos e componentes do BGE em função do pH (a) com faixa de pH variando de 0 a 14 e (b) com restrição a faixa de pH de 9,5 a 14.



Fonte: dos autores, 2022. Dados para construção da curva obtidos no software

Peakmaster^{®22}.

Tabela 2. Mobilidades eletroforéticas dos aminoácidos estudados e dos componentes do eletrólito de corrida.

Função no método	Composto	pKa	Mobilidades iônicas ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Analitos	Gly	2,32; 9,78	39,5; -37,4
	Pro	1,85; 10,6	35,8; 29
	Hyp	1,78; 9,82	32,7; -30,1
	Ser	2,13; 9,30	33,4; -33,6
	Tyr	2,18; 9,10; 10,19	26,3; -20,0; -40,0
BGE	His	2,01; 6,04; 9,33	47,5; 26,8; -28,3
	Butilamina	10,6	37,7

Fonte: dados disponíveis no *software Peakmaster*^{®22}.

A curva de mobilidade efetiva dos aminoácidos indicou que na região de pH entre 9 e 14, as mobilidades dos analitos possuem maior distinção entre si do que na região de pH ácido, entre zero e 3,5. Na faixa básica, acima de pH 11,2, as mobilidades dos analitos apresentam valores constantes, o que assegura o equilíbrio químico deslocado para a predominância dos analitos em uma única espécie. Nessa faixa de pH os aminoácidos encontram-se carregados negativamente e a separação eletroforética em um capilar de sílica ocorre no modo contra eletrosmótico, no qual os analitos estão submetidos a um EOF de alta mobilidade positiva ($+55 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sendo dessa forma conduzidos pelo EOF em direção a janela de detecção do capilar⁴².

A avaliação do perfil de mobilidade efetiva versus pH para os aminoácidos alvo demonstrou que em um valor de pH próximo de 11,2, ou ligeiramente superior, seria ideal como condição de compromisso. Para obter um BGE com valores de pH superiores seria necessária uma quantidade de butilamina elevada, o que aumentaria a força iônica do BGE e, conseqüentemente, a corrente elétrica do sistema contribuindo para o efeito Joule pronunciado comprometendo os sinais dos analitos⁴³.

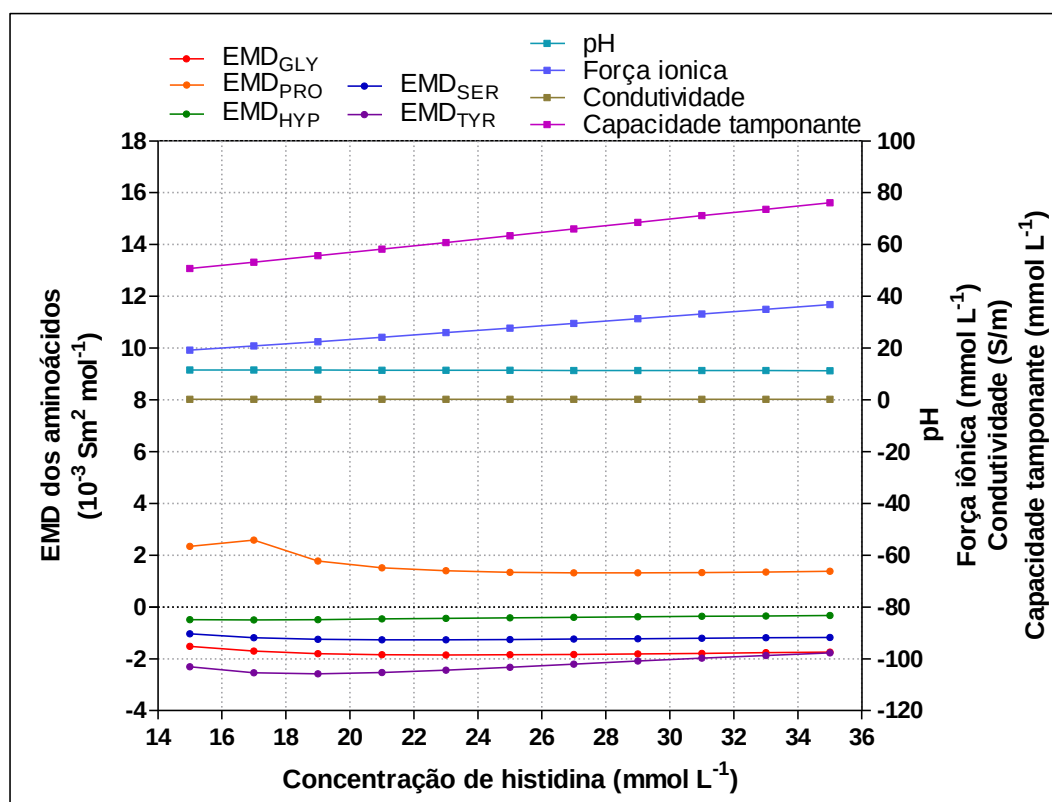
Os componentes do BGE, além de retornarem à condição de pH apropriada também precisam conter características que viabilizem a detecção. Com relação aos

analitos, a Tyr possui em sua estrutura grupos cromóforos, enquanto que a Gly, Pro, Hyp e Ser não absorvem no UV. Desse modo, a seleção do co-íon do BGE baseou-se na característica de absorção no UV permitindo a detecção indireta dos analitos não cromóforos em um dado comprimento de onda. Ao mesmo tempo, esse co-íon precisa propiciar a detecção direta do analito cromóforo em um comprimento de onda diferente da detecção indireta. Além disso, para obtenção de sinais simétricos, a mobilidade ideal para o co-íon precisa ser próxima a mobilidade efetiva média dos principais aminoácidos alvo, a fim de minimizar a EMD. O co-íon que atendeu as características supracitadas foi a His, permitindo a detecção indireta dos analitos em 220 nm.

O contra-íon presente no BGE deve ser um composto sem grupos cromóforos na estrutura, para não interferir no sinal obtido dos analitos, e que promova uma capacidade tamponante adequada na região do pH selecionado. Diante disso, o contra-íon sugerido foi a butilamina, a qual apresenta pK_a de 10,6²², o que irá assegurar uma capacidade tamponante apropriada para o pH do BGE que será utilizado na separação dos aminoácidos.

Da simulação das proporções dos componentes do BGE pelo *software Peakmaster*® parâmetros como pH, força iônica, capacidade tamponante, condutividade e EMD dos analitos foram avaliados. O gráfico que contém esses parâmetros simulados com butilamina fixa em 180 mmol L⁻¹ e variando a concentração de His está apresentado na Figura 4.

Figura 4. Resultados da avaliação dos parâmetros do método de separação dos aminoácidos usando o *software Peakmaster®*. Condições experimentais usadas na simulação com o *Peakmaster®*: capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo $\times$ 75 μ m diâmetro interno), detecção indireta, concentração de butilamina fixa em 180 mmol L⁻¹ e voltagem aplicada de 30 kV.



Fonte: dos autores, 2022.

Na Figura 4, a avaliação dos parâmetros revela que a condutividade permaneceu constante e em valores aceitáveis independente da composição do BGE. O pH variou dentro da faixa definida como ideal para a boa resolução dos analitos em todas as composições avaliadas. Entre valores de 22 a 36 mmol L⁻¹ de His, a Gly, Pro, Hyp, Ser e Tyr apresentam valores de EMD menores que 3,0, cujos sinais analíticos são considerados simétricos⁵⁸. Uma relação linear com a concentração de His foi observada para a capacidade tamponante e a força iônica, de maneira que os valores adequados foram, respectivamente, de maior e menor magnitude, para garantir a característica de tampão do BGE não comprometendo a separação em termos de elevada corrente e efeito Joule, que implicaria na inviabilidade da análise.

Assim, a condição de compromisso foi verificada em concentração de 25 mmol L⁻¹ de His.

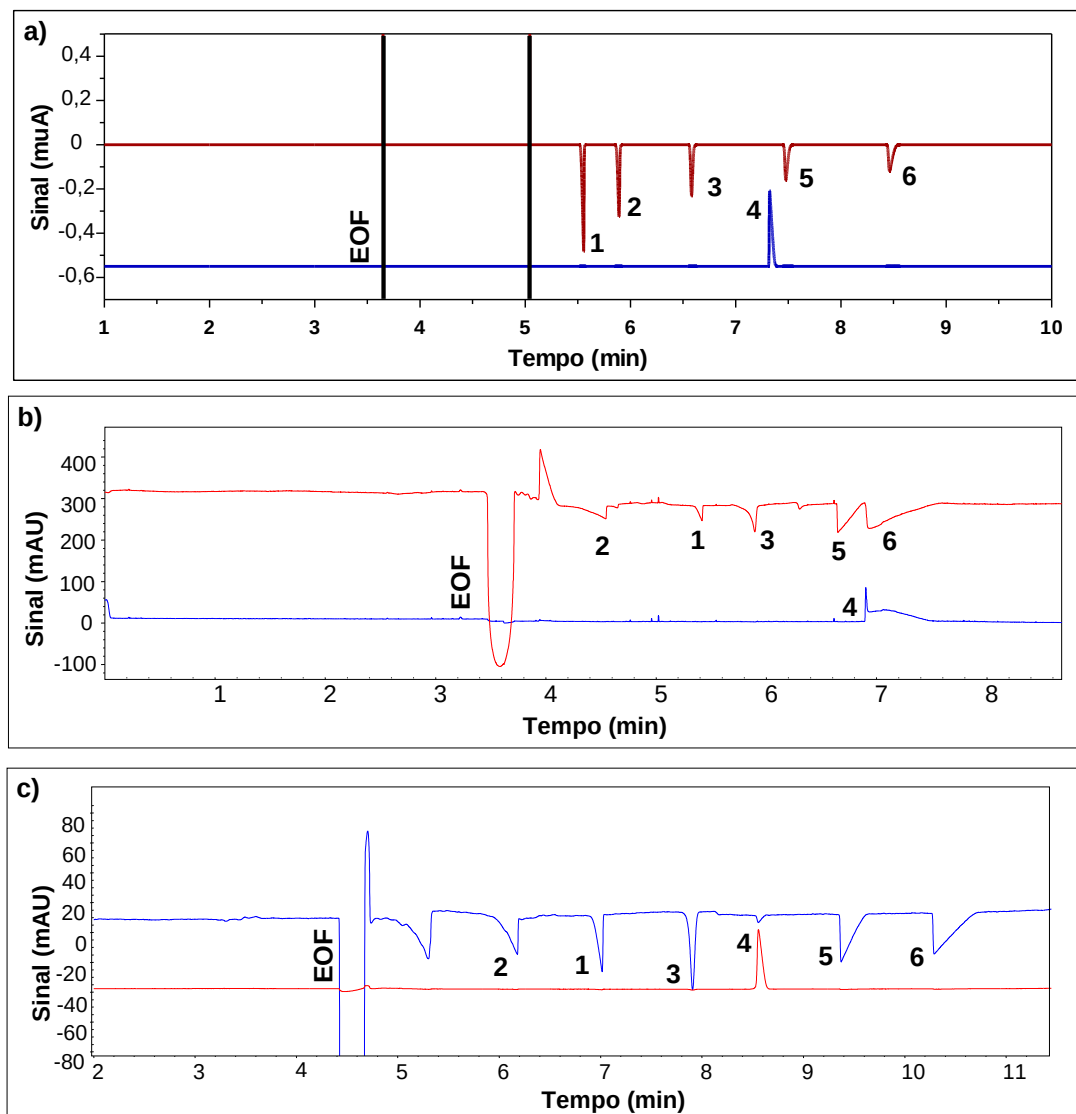
5.1.2 Eletroferogramas experimentais e simulados e a seleção do padrão interno

Uma análise experimental nas condições simuladas no *software Peakmaster*[®] foi realizada. A metodologia desenvolvida pelo doutorando Victor Rodrigues Alves reporta a utilização da temperatura de 12,5 °C e adição de 10 mmol L⁻¹ de β -CD no BGE, dois fatores não simuláveis no *Peakmaster*[®], e uma análise experimental com essas condições também foi realizada. O eletroferograma simulado utilizando o *software* encontra-se na Figura 5a e os eletroferogramas experimentais contendo os analitos em condições simuladas e não simuláveis, se encontram nas Figuras 5b e 5c respectivamente.

A avaliação dos resultados da simulação via *software* (Figura 5a) indica uma boa performance do método em separar os aminoácidos de interesse em um tempo razoável de separação. Do eletroferograma experimental, nas mesmas condições da simulação (Figura 5b) foi possível observar que a ordem de migração dos analitos foi distinta somente para o padrão interno e a Pro, indicando o importante papel da ferramenta *Peakmaster*[®]. O eletroferograma da Figura 5b, a 20 °C, demonstrou falta de resolução dos sinais da Ser e Gly, além de instabilidade na linha base para detecção direta e indireta, enquanto que o eletroferograma experimental com temperatura de 12,5 °C e adição de 10 mmol L⁻¹ de β -CD no BGE (Figura 5c) demonstrou melhor resolução e eficiência dos sinais, além de estabilidade da linha base.

O fato de o método ter sido previamente desenvolvido para a determinação exclusiva da Hyp fica evidente ao visualizar os aminoácidos que migram antes e depois de seu tempo e que possuem, respectivamente, distorções frontais e caudais, e ainda assim podem ser considerados simétricos e adequados para inferências quantitativas.

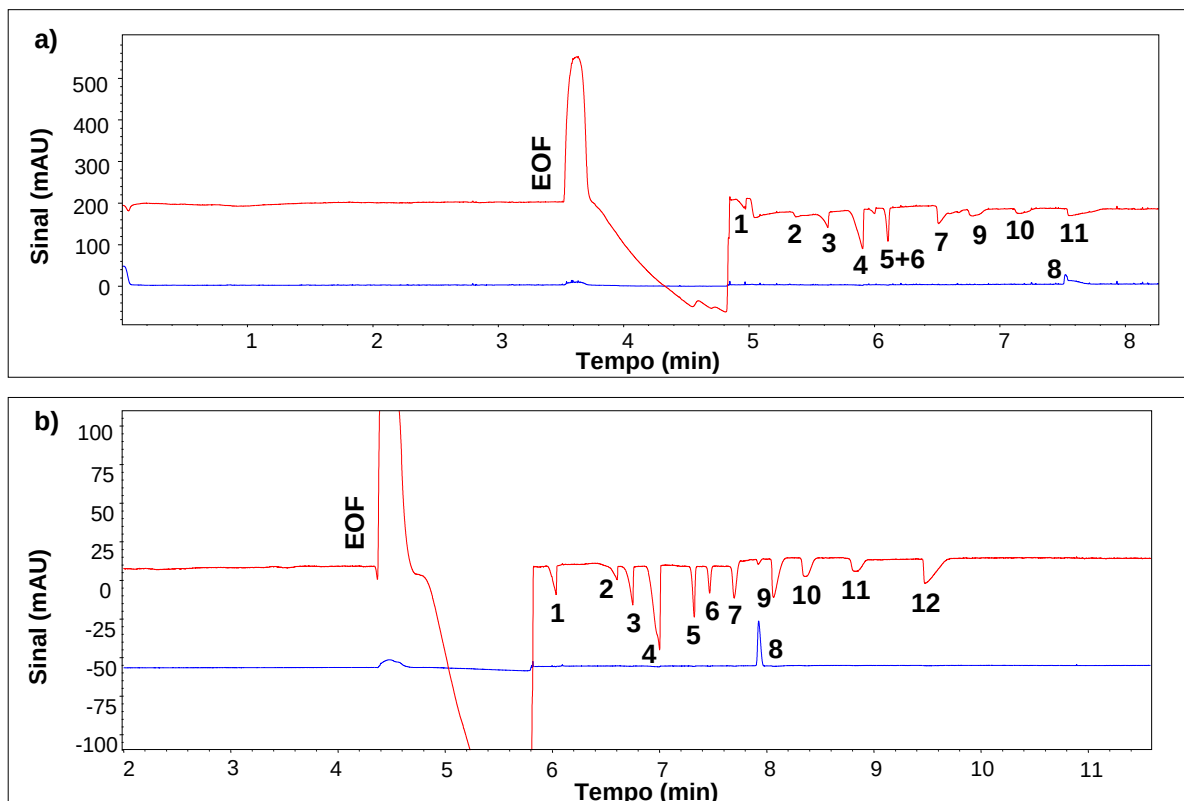
Figura 5. (a) Eletroferograma simulado com o *software Peakmaster*[®]; padrão interno e analitos em concentração média, mobilidade do EOF de $50 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, capilar de 64,5 cm (56 cm efetivo), detecção indireta e direta, BGE composto por 180 mmol L^{-1} de butilamina e 25 mmol L^{-1} de His, voltagem aplicada de 30 kV e pH de 11,4. (b) Eletroferograma experimental dos analitos em temperatura de 20°C com capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L^{-1} de butilamina, 25 mmol L^{-1} de His, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4, padrão interno e analitos injetados na concentração de 25 mg L^{-1} . (c) eletroferograma usando as mesmas condições experimentais descritas, porém em temperatura de $12,5^\circ \text{C}$ com 10 mmol de $\beta\text{-CD}$ no BGE. Legenda: 1 – HEPES, 2 – Pro, 3 – Hyp, 4 – Tyr, 5 – Ser, 6 – Gly.



Fonte: dos autores, 2022.

A metodologia desenvolvida pelo doutorando Víctor Rodrigues Alves reporta a redução de temperatura e presença de β -CD no BGE como necessárias para o alcance de resultados apreciáveis de separação, aumentando a qualidade dos sinais dos analitos e evitando a comigração de aminoácidos interferentes. De fato, a adição de outros aminoácidos nas condições sem aditivos não permitiu a identificação de todos os analitos, devido a presença de comigração das espécies. Os eletroferogramas que ilustram este experimento se encontram na Figura 6.

Figura 6. (a) Eletroferograma dos analitos e aminoácidos interferentes em temperatura de 20 °C usando capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 25 mmol L⁻¹ de His, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4, padrão interno e analitos injetados na concentração de 25 mg L⁻¹ e (b) eletroferograma usando as mesmas condições experimentais descritas, porém em temperatura de 12,5 °C e com 10 mmol de β -CD no BGE. Legenda: 1 – Pro, 2 – Phe, 3 – HEPES, 4 – Leu, Ile e Val, 5 – Hyp, 6 – Met, 7 – Ala, 8 – Tyr, 9 – Thr, 10 – Asn, 11 – Ser, 12 – Gly.



Fonte: dos autores, 2022.

A Figura 6a demonstra o comprometimento da identificação da Hyp devido a presença de comigração com a Met enquanto que a Figura 6b apresenta a ausência de comigração com os analitos, além de ser observada uma melhora na resolução dos sinais e na linha de base do eletroferograma, corroborando a eficácia da redução de temperatura e adição de β -CD.

Após a avaliação da aplicabilidade do BGE para os analitos selecionados foi necessário definir o padrão interno para auxiliar na reprodutibilidade das análises, e o *software Peakmaster*[®] foi utilizado durante essa seleção. Para a escolha de um padrão interno adequado deve ser levado em conta que o mesmo precisa possuir características semelhantes aos analitos, como não absorver no UV, possuir uma baixa EMD na separação, estar carregado negativamente no pH do sistema e ter mobilidade eletroforética próxima a dos analitos, a fim de migrar em tempo próximo a eles. Além disso, é imprescindível que o padrão interno não esteja presente na matriz das amostras analisadas para que não haja qualquer tipo de interferência que prejudique a calibração do método⁵⁹.

Os eletroferogramas obtidos na avaliação do padrão interno demonstraram que, dentre os compostos analisados, apenas o HEPES não apresentou comigração com nenhum sinal proveniente das amostras, sendo este escolhido como padrão interno. Dessa forma, após avaliar as condições de separação dos analitos e o padrão interno adequado ao método, os resultados se apresentaram promissores para a análise dos cinco aminoácidos de interesse e se fez necessário a continuidade de seu estudo através de ferramentas de validação analítica.

5.2 Parâmetros analíticos de mérito

5.2.1 Conformidade do sistema

A avaliação da conformidade do sistema foi realizada antes dos procedimentos de validação para averiguar o funcionamento do sistema de análise e garantir sua capacidade de fornecer resultados confiáveis⁵². Os resultados de CV para a razão de tempo de migração e razão de área do sinal dos analitos, respectivamente pelo tempo e área do padrão interno, se encontram na Tabela 3. A aplicabilidade de

recipientes que contém o BGE utilizados durante as injeções, com volume de 0,75 mL e de 1,5 mL, também foi estudada.

Tabela 3. Coeficiente de variação de dez injeções consecutivas da solução contendo padrão interno e analitos.

Analitos	CV (%) ^a			
	Área do sinal		Tempo de migração	
Gly	2,70 ^b	4,39 ^c	1,49 ^b	1,71 ^c
Hyp	6,13 ^b	2,17 ^c	0,57 ^b	0,49 ^c
Pro	15,61 ^b	2,62 ^c	0,79 ^b	0,85 ^c
Ser	11,62 ^b	3,64 ^c	0,86 ^b	1,40 ^c
Tyr	3,59 ^b	2,96 ^c	1,14 ^b	0,77 ^c

^a Coeficiente de variação calculado através da equação: $CV = (P/U) \times 100$, em que P é o desvio padrão absoluto e U é a média aritmética das razões de áreas dos compostos analisados pela área do padrão interno ou média aritmética do tempo de migração dos compostos pelo tempo de migração do padrão interno; ^b Resultados utilizando recipientes de 0,75 mL; ^c Resultados utilizando recipientes de 1,5 mL. Fonte: dos autores, 2022.

Os resultados de CV para recipientes de 1,5 mL foram melhores que 4,39% para razão de área, representando um aprimoramento significativo em relação ao mesmo parâmetro avaliado quando os recipientes são os de menor volume. Enquanto que, para a razão dos tempos de migração, a diferença não foi substancial variando o volume do recipiente. A utilização de recipientes com maior volume reduziu o impacto da eletrólise, fenômeno que reduz a capacidade tamponante do eletrólito, gerando alterações no pH⁶⁰.

A ocorrência de eletrólise pode alterar a mobilidade dos analitos e seus tempos de migração, além de prejudicar a obtenção de eletroferogramas com boa resolução após injeções consecutivas. Diante dos resultados, optou-se pela utilização de recipientes para o BGE com 1,5 mL. Como todos os valores de CV para os analitos foram apropriados, os resultados do ensaio demonstram que o método de análise foi adequado para o prosseguimento com a validação⁶¹.

5.2.2 Seletividade

Após o tratamento das amostras com um processo de hidrólise ácida, os interferentes dos analitos são os demais aminoácidos naturalmente encontrados nas matrizes estudadas. Os aminoácidos que sofrem degradação com o processo de hidrólise utilizado e não foram adicionados ao ensaio são o Trp, a Met e a Cys, enquanto que Asp, Glu e Arg não foram adicionados pois esses não migram dentro da janela de separação dos demais analitos. A seletividade foi avaliada em 220 nm pois apenas o analito Tyr, dentre todos os aminoácidos analisados, apresenta sinal em 240 nm.

Através de uma análise com os aminoácidos interferentes, o eletroferograma apresentado na Figura 6b foi obtido, com o qual foi possível observar o não comprometimento da análise, pois não houveram comigrações com os analitos, de modo que o método se apresenta seletivo para os aminoácidos alvo. É atribuída a importância de o método utilizar baixa temperatura e conter a presença de β -CD no BGE, a fim de impedir a ocorrência de comigração com os analitos (Figura 6a) e melhorar a resolução do eletroferograma obtido.

5.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LD e LQ obtidos pela razão sinal/ruído dos eletroferogramas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de LD e LQ obtidos através da relação sinal/ruído dos eletroferogramas das separações dos analitos.

Analitos	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Gly	1,95	6,51
Hyp	1,18	3,94
Pro	1,53	5,10
Ser	1,55	5,17
Tyr	0,507	1,69

Fonte: dos autores, 2022.

Observa-se pela Tabela 4 que os valores obtidos de LD foram abaixo de 1,95 mg L⁻¹ e os valores obtidos de LQ foram abaixo de 6,51 mg L⁻¹. Esses valores são adequados para a quantificação dos analitos nas amostras, uma vez que eles se apresentam em concentrações relativamente elevadas.

5.2.4 Linearidade

A partir dos resultados obtidos pelas curvas de calibração com padronização interna dos analitos, foram gerados gráficos de regressão linear, cujos dados se encontram dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da linearidade das curvas de calibração com padronização interna para os analitos.

Parâmetros ^a	Analitos				
	Gly	Hyp	Pro	Ser	Tyr
Linearidade - Faixa de calibração (mg L ⁻¹)	7 - 91	7 - 91	7 - 91	7 - 91	7 - 91
Linearidade - Inclinação (L mg ⁻¹)	0,053	0,028	0,029	0,040	0,026
Desvio padrão - Inclinação	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
Linearidade - Intercepto	-0,126	-0,098	-0,027	-0,172	-0,116
Desvio padrão - Intercepto	0,136	0,060	0,041	0,107	0,069
Linearidade - Coeficiente de determinação (R ²)	0,993	0,995	0,996	0,992	0,992

^a Curva analítica construída em seis níveis de concentração, cada ponto preparado em triplicata e corrigido pela área do padrão interno. Fonte: dos autores, 2022.

O coeficiente de determinação (R²) das cinco curvas de calibração apresentaram valores superiores a 0,99, o que é adequado já que o valor teórico ideal de R² é 1⁵⁴. Da avaliação da distribuição dos resíduos da regressão linear, os quais se encontram no Apêndice B, foi observado que a distribuição tem perfil aleatório e variâncias constantes, comprovando sua homoscedasticidade⁶². A verificação de possíveis valores discrepantes (*outliers*) através do teste de Grubbs, confirmou a ausência de *outliers*.

A avaliação de ajuste do modelo linear aos dados foi efetuada pelo teste F, e os resultados encontram-se no Apêndice B. Os valores de F_{Calculado} foram menores

que F_{Tabelado} , de modo que a hipótese nula que atesta que os resíduos possuem variância equivalente pode ser aceita, garantindo que há ajuste do modelo linear. Ainda, para avaliação da significância da regressão linear, como os valores de $F_{\text{Calculado}}$ foram maiores que F_{Tabelado} , a hipótese nula que atesta não haver correlação linear significativa entre as variáveis pode ser rejeitada, ou seja, a inclinação da curva obtida não é nula. Do teste de Shapiro-Wilk foi avaliada a normalidade dos resíduos e os resultados são apresentados no Apêndice C. Foi observado que os valores de $W_{\text{Calculado}}$ foram maiores que os valores de W_{Tabelado} , de modo que a hipótese nula pode ser aceita, indicando que os dados provêm de uma distribuição normal.

Os resíduos das regressões dos analitos seguiram as premissas de distribuição normal e homocedástica, e foram comprovados o ajuste do modelo linear e a significância da regressão, de modo que pode ser afirmado que as curvas analíticas são lineares no intervalo de 7,0 a 91,0 mg L⁻¹.

5.2.5 Estudos de efeito de matriz

A partir dos resultados obtidos pelas curvas de adição de padrão, foram gerados gráficos de regressão linear e os dados se encontram dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da linearidade das curvas de calibração com adição de padrão para os analitos.

Parâmetros ^a	Analitos				
	Gly	Hyp	Pro	Ser	Tyr
Linearidade - Faixa de calibração (mg L ⁻¹)	7 - 91	7 - 91	7 - 91	7 - 91	7 - 91
Linearidade - Inclinação (L mg ⁻¹)	0,055	0,028	0,031	0,042	0,054
Desvio padrão - Inclinação	0,003	0,001	0,001	0,001	0,002
Linearidade - Intercepto	2,0	0,65	0,68	0,21	-0,031
Desvio padrão - Intercepto	0,15	0,031	0,059	0,036	0,12
Linearidade - Coeficiente de determinação (R ²)	0,991	0,998	0,995	0,999	0,994

^a Curva analítica construída em seis níveis de concentração, cada ponto preparado em triplicata e corrigido pela área do padrão interno. Fonte: dos autores, 2022.

O coeficiente de determinação (R^2) das cinco curvas de calibração apresentaram valores superiores a 0,99. A partir das curvas de calibração foram gerados gráficos de resíduos para avaliação da sua distribuição, os quais se encontram no Apêndice D. Analisando os gráficos é possível observar que a distribuição dos resíduos é aleatória, de modo que suas variâncias são constantes. Também foi efetuada a verificação de possíveis *outliers* através do teste de Grubbs, no qual foi confirmada a presença de um *outlier* referente a uma das triplicatas para a Ser no nível de concentração de 35,0 mg L⁻¹. Dessa forma, a avaliação dos parâmetros estatísticos da regressão linear para a Ser foi efetuada eliminando o *outlier*.

Os resultados da avaliação de ajuste do modelo linear e da validade da regressão linear encontram-se no Apêndice E. De acordo com os dados, o ajuste do modelo linear foi aceito devido aos valores de $F_{\text{Calculado}}$ serem menores que F_{Tabelado} . A significância da regressão linear também foi atestada, pois os valores de $F_{\text{Calculado}}$ foram maiores que F_{Tabelado} . Os resultados da avaliação da normalidade dos resíduos obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk estão apresentados no Apêndice F, e indicam a distribuição normal dos resíduos devido aos valores de $W_{\text{Calculado}}$ serem maiores que W_{Tabelado} .

Para avaliação do efeito de matriz as inclinações das curvas com padronização interna e das curvas com adição de padrão foram submetidas ao teste F para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste t de Student para avaliar se as variáveis eram significativamente distintas. Se as variâncias são homogêneas aplica-se o teste t de Student para amostras com variâncias equivalentes, e quando as variâncias são heterogêneas aplica-se o teste t de Student para variâncias distintas. Os resultados para os dois testes se encontram no Apêndice G.

De acordo com os cálculos observou-se que $F_{\text{Calculado}}$ foi maior que F_{Tabelado} para todos os analitos exceto a Tyr. Os resultados do teste t indicaram que não houve efeito de matriz para os analitos Gly, Hyp, Pro e Ser, devido aos valores de $t_{\text{Calculado}}$ serem menores que t_{Tabelado} , de modo que a quantificação destes analitos pode ser realizada utilizando a curva de calibração com padronização interna. Contudo, para a Tyr o valor de $t_{\text{Calculado}}$ foi maior que t_{Tabelado} , indicando que há diferença significativa

entre as inclinações das curvas de calibração analisadas e, portanto, há efeito de matriz para o analito. Dessa forma, esse analito não pode ser quantificado de forma confiável através da curva de calibração por padronização interna e a curva de adição de padrão deve ser utilizada para essa finalidade.

5.2.6 Precisão

Foram avaliadas a precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados se encontram na Tabela 7 e são apresentados em termos do CV da área dos analitos corrigida pela área do padrão interno e pelo CV do tempo de migração dos analitos corrigida pelo tempo de migração do padrão interno.

Tabela 7. Valores de precisão instrumental, repetibilidade e precisão inter-ensaio avaliados em termos do CV para os analitos.

Concentração (mg L ⁻¹)	Analito	Instrumental ^a (CV%)		Repetibilidade ^b (CV%)		Inter-ensaio ^a (CV%)	
		Área	T _{migração}	Área	T _{migração}	Área	T _{migração}
7,0	Gly	-	-	3,95	0,268	8,10	0,899
	Hyp	-	-	8,61	0,133	9,78	0,209
	Pro	-	-	11,3	0,0126	8,92	0,208
	Ser	-	-	0,704	0,152	8,21	0,738
	Tyr	-	-	7,64	0,183	9,70	0,876
49,0	Gly	0,720	2,77	7,45	1,92	2,60	2,82
	Hyp	0,436	0,149	9,17	0,532	5,21	2,28
	Pro	0,976	0,264	13,3	0,756	10,1	4,43
	Ser	0,500	0,424	4,00	1,55	4,28	2,62
	Tyr	0,303	0,218	1,72	0,831	4,84	2,40
91,0	Gly	-	-	5,32	1,02	6,44	2,00
	Hyp	-	-	3,60	0,700	5,72	1,32
	Pro	-	-	11,2	0,581	6,80	4,08
	Ser	-	-	6,66	1,08	8,58	2,45
	Tyr	-	-	1,54	0,735	8,65	0,631

^an = 9; ^bn = 3. Fonte: dos autores, 2022.

De acordo com a Tabela 7 os ensaios de precisão instrumental apresentaram coeficientes de variação com valores entre 0,303% a 0,976%, e para a área do sinal

valores entre 0,149% a 2,77% para o tempo de migração. A repetibilidade apresentou coeficientes de variação com valores entre 0,704% a 13,3% para a área do sinal e valores entre 0,0126% a 1,92% para o tempo de migração. Na precisão inter-ensaio, os valores dos coeficientes de variação variaram de 2,60% a 10,1% para a área e entre 0,208 a 4,43% para o tempo de migração.

De forma geral, todos os valores de precisão foram adequados para o método e se apresentaram até a ordem de 11%⁵⁰, exceto a repetibilidade para a Pro no nível de concentração de 49,0 mg L⁻¹, cujo valor se distancia levemente do nível adequado. Apesar disso, para os demais ensaios de precisão no mesmo nível de concentração para a Pro os valores se mostraram próximos do adequado, o que assegura a precisão do método para a análise desse aminoácido.

5.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi medida pelo ensaio de recuperação com quantidades conhecidas de Gly, Hyp, Pro, Ser e Tyr adicionadas em amostras de cola animal. Os resultados do ensaio assim como as concentrações dos padrões adicionados à matriz estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de recuperação dos analitos obtidos em três níveis de concentração adicionados à matriz de cola animal com o desvio padrão de cada medida.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)				
	Gly	Hyp	Pro	Ser	Tyr
21,0	121,3±20,5	101,4±11,0	107,8±15,8	98,5±1,7	95,6±3,4
63,0	102,6±4,7	100,6±6,2	96,4±1,9	99,2±2,4	91,3±7,1
91,0	97,6±5,0	101,2±1,7	99,3±7,0	99,1±4,1	102,5±3,9

Fonte: dos autores, 2022.

Os valores obtidos para o ensaio são considerados adequados, pois se encontram no intervalo entre 80% e 110%⁵⁰, excetuando-se o valor encontrado para a Gly em concentração de 21,0 mg L⁻¹, o qual difere ligeiramente da faixa estabelecida como aceitável.

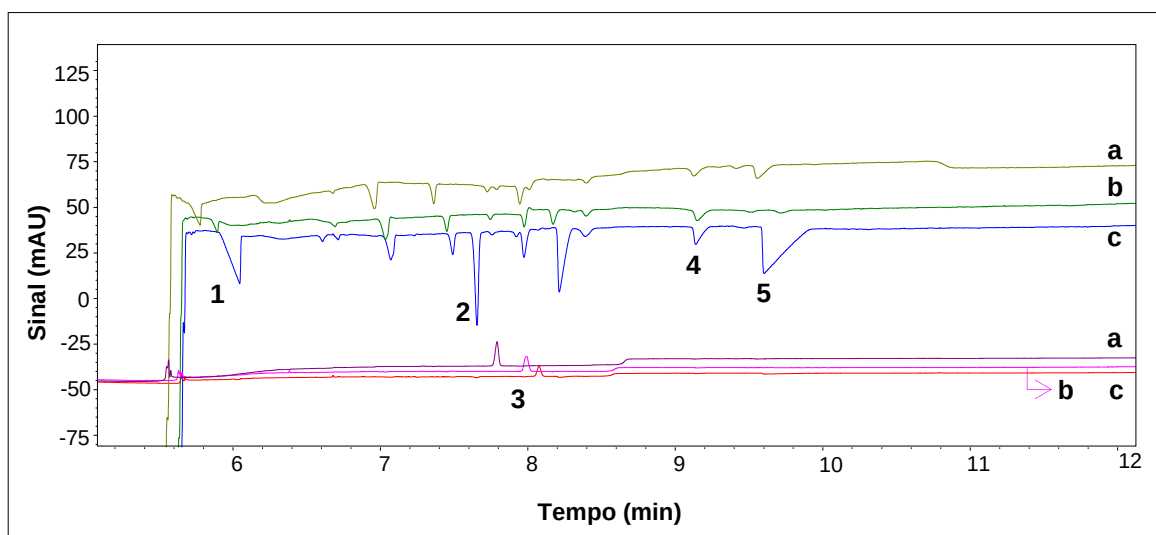
5.3 Análise das amostras

Com o processo de validação analítica constatou-se que o método proposto pode ser aplicado para a análise de amostras reais de aglutinantes proteicos. Diante disso, as amostras de cola animal, gema de ovo e caseína foram preparadas em triplicatas autênticas e submetidas ao processo de hidrólise ácida utilizando o ácido sulfúrico como alternativa ao ácido clorídrico. Este último, comumente empregado em procedimentos de hidrólise ácida para a análise de aminoácidos, foi substituído visando o posterior tratamento do hidrolisado antes da injeção no equipamento de CE.

A presença de excesso de íons provenientes do ácido utilizado na hidrólise impossibilita uma análise apreciável por CZE, devido ao aumento de corrente elétrica no interior do capilar e ao maior potencial de ocorrência do efeito Joule, o que leva a instabilidade na linha de base e sinais distorcidos. A simultânea neutralização e precipitação do hidrolisado com a utilização de carbonato de estrôncio permitiu a redução da força iônica da amostra, levando a uma análise por CZE sem comprometimento dos sinais. A utilização desse composto permitiu a neutralização sem elevar a força iônica, pois o carbonato de estrôncio possui baixa solubilidade em meio aquoso. Dessa forma, a força iônica do hidrolisado foi ajustada com a conversão de íons sulfato em um sal insolúvel de estrôncio (SrSO_4 , $K_{ps} = 3,2 \cdot 10^{-7}$)⁶³ enquanto que os íons hidrônio foram convertidos em ácido carbônico, o qual se decompôs em gás carbônico e água.

Os eletroferogramas obtidos para avaliação do perfil das diferentes amostras se encontram na Figura 7, os quais mantiveram um perfil semelhante aos eletroferogramas com solução de padrões, independentemente do tipo de amostra. A presença dos analitos Gly, Pro, Hyp, Ser e Tyr foi confirmada através de adição de padrão nas amostras, assim como demais aminoácidos presentes nas matrizes. A ausência do aminoácido Hyp nas amostras de caseína e gema de ovo permitiu a identificação qualitativa da cola animal, sem necessidade de análises quantitativas para sua identificação, o que pode ser considerado na situação do presente trabalho em que as amostras não apresentaram mais de um aglutinante em sua constituição.

Figura 7. Eletroferogramas das amostras sem padrão interno empregando o método validado. Capilar com 64,5 cm de comprimento total (56 cm efetivo), detecção indireta em 220 nm e detecção direta em 240 nm, BGE composto por 180 mmol L⁻¹ de butilamina, 25 mmol L⁻¹ de His e 10 mmol de β -CD, injeção hidrodinâmica com 50 mbar por 15 s, voltagem aplicada de 30 kV, pH de 11,4 em temperatura de 12,5 °C, amostras de caseína e cola animal diluídas 10 vezes, amostra de gema de ovo sem diluição. Legenda: a – caseína, b – gema de ovo, c – cola animal, 1 – Pro, 2 – Hyp, 3 – Tyr, 4 – Ser, 5 – Gly.



Fonte: dos autores, 2022.

Os valores de concentração obtidos para cada aminoácido estão apresentados na Tabela 9. Para o cálculo da concentração foi considerado que a amostra de cola animal e caseína eram constituídas integralmente de proteína, e que para a gema existe uma relação de 16 g de proteína para 100 g de gema¹⁵.

Tabela 9. Resultados da quantificação dos analitos com o desvio padrão de cada resposta para amostras de cola animal, gema de ovo e caseína.

Concentração (mg 100mg ⁻¹)					
Amostra	Gly ^a	Pro ^a	Hyp ^a	Ser ^a	Tyr ^b
Cola animal	44,1±0,3	27,3±0,2	28,1±0,2	7,75±0,10	3,21±1,35
Gema de ovo	5,17±0,10	6,65±0,10	ND ^c	16,2±0,2	NA ^d
Caseína	2,51±0,01	12,6±0,1	ND ^c	10,9±0,1	NA ^d

^a Resultados obtidos através da curva de calibração aquosa com padronização interna;

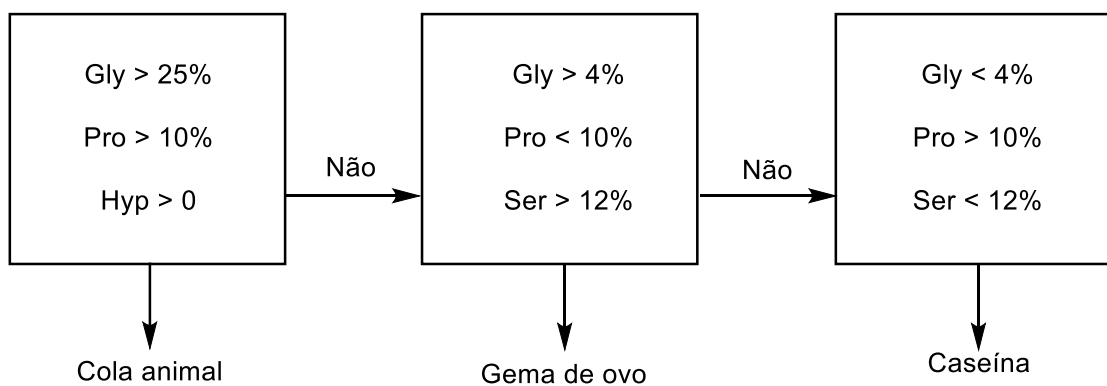
^b Resultados obtidos através da curva de adição de padrão; ^c Não detectado; ^d Não analisado.

Fonte: dos autores, 2022.

Através da Tabela 9 pode ser observado que os aminoácidos mais abundantes para os aglutinantes cola animal e gema de ovo se mostraram equivalentes ao reportado pela literatura. Contudo, as abundâncias relativas dos aminoácidos foram distintas dos valores esperados, sendo a amostra caseína a que se assemelha mais aos dados da Tabela 1 da seção 2.2. A abundância da tirosina foi verificada apenas para a cola animal através da curva de adição de padrão e, para a quantificação nas demais matrizes, é necessário a realização de curvas de calibração com adição de padrão para gema de ovo e caseína.

O número de trabalhos que relatam a abundância relativa de aminoácidos em amostras de aglutinantes proteicos é limitado, havendo a necessidade de avaliar um grupo maior de amostras, variando as origens de cola animal, caseína e gema de ovo. Essa limitação pode contribuir para explicar a diferença observada na abundância relativa dos aminoácidos nas amostras avaliadas em relação ao reportado na literatura. Com os resultados obtidos nesse trabalho, foi possível realizar a diferenciação das origens dos aglutinantes, através do auxílio de um diagrama de exclusão, ilustrado pela Figura 8.

Figura 8. Diagrama de exclusão para a identificação da origem dos aglutinantes proteicos.



Fonte: dos autores, 2022.

Com o auxílio do diagrama é possível obter a origem do aglutinante proteico de acordo com as abundâncias dos aminoácidos obtidas pelo método validado, de modo similar ao reportado por demais trabalhos disponíveis na literatura^{8, 18}. Para a avaliação de amostras que contenham uma mistura dos três aglutinantes é necessária

a ampliação do trabalho proposto através da investigação de aglutinantes com diferentes proporções proteicas. Para auxiliar a caracterização dessas amostras mais complexas, a utilização de um banco de amostras maior juntamente com a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) poderia ser efetuada, como alguns trabalhos na literatura acerca do tema já relataram^{10, 64}.

5.4 Comparação com outros métodos da literatura

A Tabela 10 apresenta um resumo com as principais características de alguns métodos que envolvem a análise de aminoácidos, tais como tipo de amostra, preparo de amostra, aminoácidos analisados, técnica empregada, tempo de análise, faixa linear, LD, LQ e recuperação. Ao comparar o método proposto neste trabalho aos demais citados é possível notar vantagens no método utilizado quanto ao tempo de análise e ausência de etapa de derivatização. Além disso, o método utiliza de baixos volumes de solução, proporcionando benefícios em relação aos custos de execução e a questões ambientais, pois a geração de resíduos é baixa.

Apesar do método não apresentar valores de LD e LQ na ordem dos demais métodos, a detecção com DAD permitiu a análise das amostras de forma satisfatória, o que indica a viabilidade da utilização do método em amostras reais de patrimônio cultural. A ausência de métodos por CZE-DAD para a avaliação de amostras do patrimônio cultural demonstra uma lacuna na literatura, e o presente trabalho se apresenta como alternativa inovadora às análises usualmente realizadas de amostras oriundas de bens culturais.

Tabela 10. Comparação de características analíticas do método proposto por CZE e demais métodos descritos na literatura empregados para a análise de aminoácidos.

Amostra	Preparo de amostra	Analitos	Técnica empregada	Tempo (min)	Faixa linear (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Rec (%)	Referência
Cerveja	Derivatização	Ala, Arg, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Trp, Tyr, Val	CE-DAD	23	3,75-44,1	0,75-4,41	2,25-13,2	82,8-111,6	45
Plasma humano	Precipitação de proteínas	Met, Glu, Cys, Gly	CE-MS/MS	25	1,47-6,18 a 2,49-59,8	4,72 10 ⁻³ -3,94 10 ⁻²	1,58 10 ⁻² -1,31 10 ⁻¹	95-108	47
Pintura de cavalete (Carrara, Itália) e sarcófago etrusco (Florença, Itália)	Extração com amônia, hidrólise ácida e derivatização	Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Met, Ser, Pro, Phe, Asp, Glu, Lys, Hyp, Tyr	GC-MS	21	-	1 10 ⁻⁵ -1,8 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁵ -3,6 10 ⁻⁴	-	65
Pintura de parede da Igreja de <i>Santa Maria delle Cerrat</i> (Puglia, Itália)	Hidrólise ácida e derivatização	Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Ser, Phe, Asp, Hyp, Glu	GC-MS	36	-	2,8 10 ⁻⁸ -4,6 10 ⁻⁷	9,4 10 ⁻⁸ -1,5 10 ⁻⁶	81-105	25
Aglutinantes proteicos	Hidrólise ácida	Gly, Pro, Hyp, Ser, Tyr	CZE-DAD	11	7,0-91,0	0,507-1,95	1,69-6,51	91,3-121,3	Método proposto

Fonte: dos autores, 2022.

6. CONCLUSÕES

Ao longo do estudo da aplicabilidade do método, a utilização do *software Peakmaster*[®] se mostrou útil, uma vez que os resultados experimentais obtidos em relação ao tempo de migração e EMD se mostraram similares às simulações, além de possibilitar a minimização do número de experimentos nessa etapa. O padrão interno selecionado para a correção da área dos analitos foi eficiente, não apresentando comigração nas amostras estudadas e auxiliando na reprodutibilidade de análises consecutivas.

O método foi validado conforme os protocolos recomendados pela EURACHEM e pelo INMETRO e demonstrou bons resultados para os parâmetros avaliados, confirmando a eficácia do método em analisar os aminoácidos de interesse. A identificação do efeito de matriz na cola animal para a Tyr apontou para a necessidade da utilização da curva de adição de padrão para sua quantificação, sendo necessária a confecção de curvas de adição de padrão para as matrizes de gema de ovo e caseína, para a quantificação adequada do analito nessas matrizes.

A análise das amostras de aglutinantes proteicos utilizando o método validado resultou em valores diferentes dos esperados segundo informações obtidas na literatura. Contudo, os aminoácidos mais abundantes da matriz de cola animal e gema de ovo permaneceram equivalentes ao observado na literatura. Através de um diagrama de exclusão, foi possível caracterizar as três amostras analisadas, o que o configura como uma ferramenta útil na diferenciação dos aglutinantes.

A comparação do método com os apresentados na literatura ressalta as vantagens do método validado, como utilização de baixos volumes de solvente, tempo reduzido de análise e processo de preparo de amostra mais simples sem necessidade de derivatização.

Dentre as perspectivas desse trabalho está a possibilidade de aplicação em amostras de patrimônio cultural, o que requer estudos de miniaturização do preparo de amostra, para adequar as análises às amostras fornecidas. Ainda, a avaliação de amostras mais complexas com misturas de aglutinantes pode ser realizada através da investigação de um número maior de amostras, com diferentes proporções proteicas.

7. REFERÊNCIAS

- ¹STUART, B. **Analytical techniques in materials conservation**. 1. ed. Sydney: John Wiley & Sons Ltd 424p., 2007.
- ²SCHELLMANN, N. C. Animal glues: a review of their key properties relevant to conservation. **Studies in Conservation**, v. 52, p. 55-66, 2007.
- ³DALLONGEVILLE, S. et al. Identification of Animal Glue Species in Artworks Using Proteomics: Application to a 18th Century Gilt Sample. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 9431–9437, 2011.
- ⁴DALLONGEVILLE, S. et al. Proteins in art, archaeology, and paleontology: from detection to identification. **Chemical reviews**, v. 116, p. 2-79, 2016.
- ⁵BRØNS, C. et al. Painting the Palace of Apries I: ancient binding media and coatings of the reliefs from the Palace of Apries, Lower Egypt. **Heritage Science**, v. 6, p. 1-20, 2018.
- ⁶HRADIL, D. et al. Late Gothic/early Renaissance gilding technology and the traditional poliment material “Armenian bole”: Truly red clay, or rather bauxite? **Applied Clay Science**, v. 135, p. 271-281, 2017.
- ⁷VILLA, P. et al. A milk and ochre paint mixture used 49,000 years ago at Sibudu, South Africa. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.
- ⁸KAML, I.; VCELAKOVA, K.; KENNDLER, E. Characterisation and identification of proteinaceous binding media (animal glues) from their amino acid profile by capillary zone electrophoresis. **Journal of separation science**, v. 27, p. 161-166, 2004.
- ⁹GIUFFRIDA, M. G.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. Back to the past: deciphering cultural heritage secrets by protein identification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5445–5455, 2018.
- ¹⁰BONADUCE, I. et al. The binding media of the polychromy of Qin Shihuang's Terracotta Army. **Journal of Cultural Heritage**, v. 9, n. 1, p. 103–108, 2008.
- ¹¹GERMINARIO, G.; TALARICO, F.; TORRE, M. Microanalyses and Spectroscopic Techniques for the Identification of Pigments and Pictorial Materials in Monet's Pink Water Lilies Painting. **Microscopy and Microanalysis**, v. 28, n. 1, p. 27-41, 2022.
- ¹²NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 1220p., 2014.
- ¹³MILLS, J.S.; WHITE, R. **The organic chemistry of museum objects**. 2 ed., London: Butterworth, 206p., 2000.
- ¹⁴COLOMBINI, M. P. et al. GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts. **Microchemical Journal**, v. 67, p. 291-300, 2000.

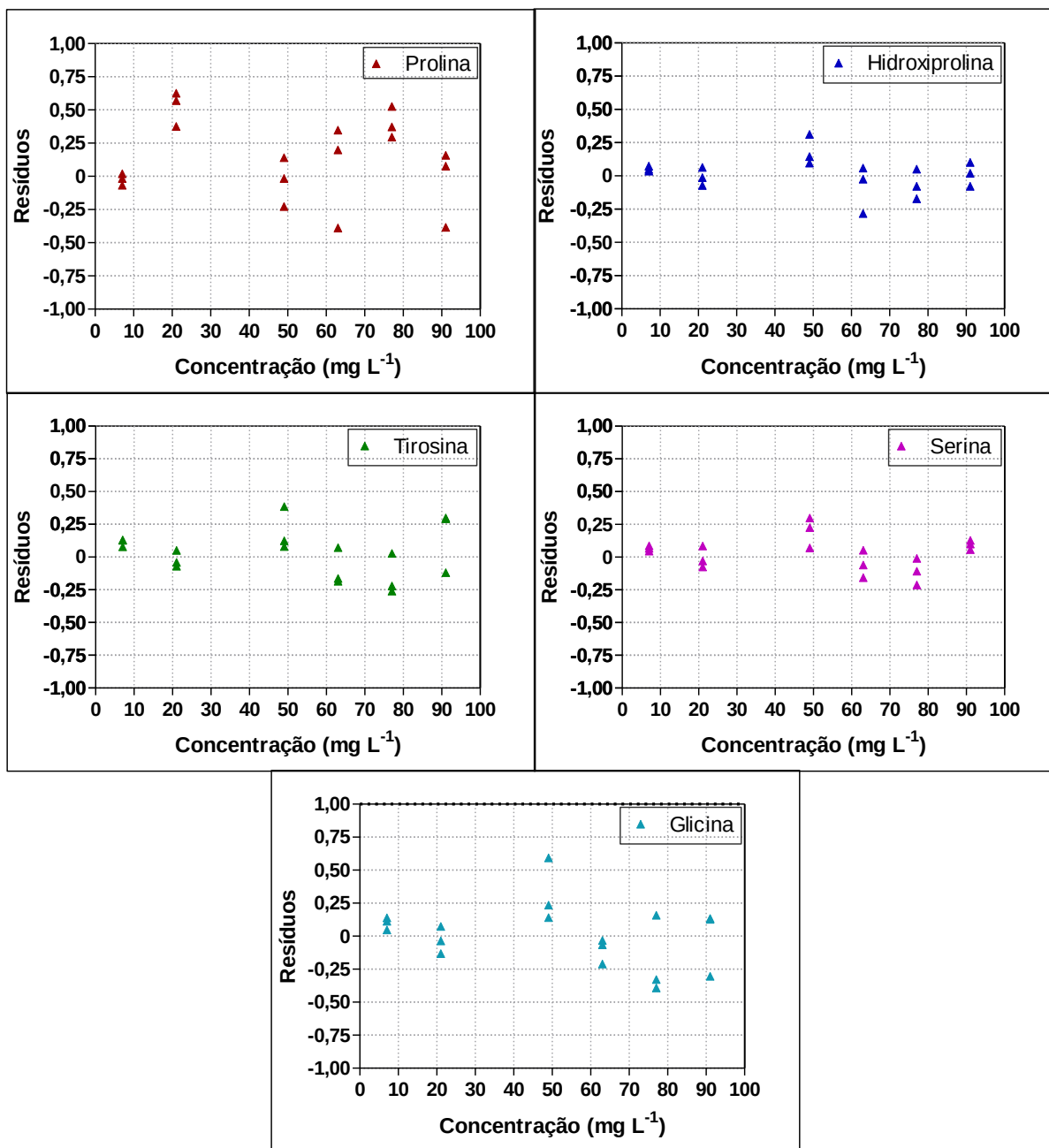
- ¹⁵ATTIA, Y. A. et al. Protein and amino acid content in four brands of commercial table eggs in retail markets in relation to human requirements. **Animals**, v. 10, n. 3, p. 406, 2020.
- ¹⁶EVANS, R. J. et al. The Amino Acid Content of Fresh and Stored Shell Eggs.: II. Arginine, Histidine, Lysine, Methionine, Cystine, Tyrosine, Tryptophan, Phenylalanine, and Proline. **Poultry Science**, v. 28, n. 5, p. 697-702, 1949.
- ¹⁷ORSINI, S. et al. Characterization of Degraded Proteins in Paintings Using Bottom-Up Proteomic Approaches: New Strategies for Protein Digestion and Analysis of Data. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 11, p. 6403–6408, 2018.
- ¹⁸KENNDLER, E. et al. Identification of proteinaceous binding media of easel paintings by gas chromatography of the amino acid derivatives after catalytic hydrolysis by a protonated cation exchanger. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 342, p. 135–141, 1992.
- ¹⁹HARRISON, S. M. et al. Animal glues in mixtures of natural binding media used in artistic and historic objects: identification by capillary zone electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1520–1526, 2005.
- ²⁰GLITCH, I. et al. Identification of proteinaceous binding media used for paintings by capillary electrophoresis with electrospray ms detection. **Chemia Analityczna**, v. 51, n. 2, p. 195–210, 2006.
- ²¹PUBCHEM. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- ²²*Peakmaster® software*. Disponível em: <<https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- ²³MUSTĂŢEA, G.; UNGUREANU, E. L.; IORGA, E. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food - progress over time: A short review. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 26, p. 81–87, 2019.
- ²⁴ANDERSEN, C. K. et al. Characterisation of preparation layers in nine Danish Golden Age canvas paintings by SEM-EDX, FTIR and GC-MS. **Heritage Science**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2017.
- ²⁵FICO, D. et al. An Enhanced GC/MS Procedure for the Identification of Proteins in Paint Microsamples. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, p. 1–8, 2018.
- ²⁶LLUVERAS-TENORIO, A. et al. Gc/ms and proteomics to unravel the painting history of the lost Giant Buddhas of Bāmiyān (Afghanistan). **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2017.

- ²⁷MAZUREK, J.; SVOBODA, M.; SCHILLING, M. GC/MS Characterization of Beeswax, Protein, Gum, Resin, and Oil in Romano-Egyptian Paintings. **Heritage**, v. 2, n. 3, p. 1960–1985, 2019.
- ²⁸KUMAZAWA, Y. et al. A novel LC–MS method using collagen marker peptides for species identification of glue applicable to samples with multiple animal origins. **Heritage Science**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ²⁹LEVY, I. K. et al. Finding of muscle proteins in art samples from mid-18th century murals by LC–MSMS. **Journal of Cultural Heritage**, v. 48, p. 227-235, 2021.
- ³⁰MA, Z. et al. Multi-analytical study of the suspected binding medium residues of wall paintings excavated in Tang tomb, China. **Journal of Cultural Heritage**, v. 24, p. 171–174, 2017.
- ³¹VANDENABEELE, P. et al. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. **Analytica Chimica Acta**, v. 407, n. 1–2, p. 261–274, 2000.
- ³²KAHROVIC, E.; JAKOVLJEVIC, V.; ZAHIROVIC, A. Ftir Investigation of Pigments and Binder of Painted Walls in Heritage Monuments. **Journal of Science and Arts**, v. 20, n. 3, p. 697–704, 2020.
- ³³DOOLEY, K. A. et al. Mapping of egg yolk and animal skin glue paint binders in Early Renaissance paintings using near infrared reflectance imaging spectroscopy. **Analyst**, v. 138, n. 17, p. 4838–4848, 2013.
- ³⁴MAZUREK, J. et al. Antibody assay to characterize binding media in paint. n. **Crowther** 2001, p. 678–685, 2006.
- ³⁵SCOTT, D. A. et al. Examination of some pigments, grounds and media from Egyptian cartonnage fragments in the Petrie Museum, University College London. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 3, p. 923-932, 2009.
- ³⁶HU, W.; ZHANG, H.; ZHANG, B. Identification of organic binders in ancient Chinese paintings by immunological techniques. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, n. 5, p. 1278-1287, 2015.
- ³⁷MAZANEK, M.; KAML, I.; KENNDLER, E. Capillary electrophoresis: an alternative to chromatography for analysis of natural organic binders. **Studies in conservation**, v. 51, n. 2, p. 139-151, 2006.
- ³⁸ASSUNÇÃO, N. A. et al. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2124–2133, 2008.
- ³⁹HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.

- ⁴⁰POINSOT, V. et al. Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods: June 2015–May 2017. **Electrophoresis**, v. 39, n. 1, p. 190–208, 2018.
- ⁴¹QUEIROZ, S.; JARDIM, I. Eletroforese capilar. **Chemkeys**, v. 8, p. 1-9, 2018.
- ⁴²VITALI, L. et al. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ-carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**, v. 123, p. 45–53, 2014.
- ⁴³TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, p. 173, 1996.
- ⁴⁴GUTTMAN, A.; HAJBA, L. **Capillary Gel Electrophoresis**. 1. Ed. Elsevier 379p., 2022.
- ⁴⁵TIAN, M. et al. Efficient capillary electrophoresis separation and determination of free amino acids in beer samples. **Electrophoresis**, v. 35, p. 577-584, 2014.
- ⁴⁶DE CARVALHO, R. C. et al. Direct determination of amino acids in brewery worts produced by different processes by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 39, p. 1613-1620, 2018.
- ⁴⁷CIESLAROVA, Z. et al. Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and homocysteine's metabolites: Potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis. **Talanta**, v. 170, p. 63-68, 2017
- ⁴⁸SOGA, T. et al. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1964-1972, 2004.
- ⁴⁹PATNI, N.; TRIPATHI, N.; BOSMIA, S. Casein extraction from various milk samples and its role as a viable substitute for conventional plastics. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 8, p. 10-13, 2013.
- ⁵⁰AOAC 990.26 method. **Hydroxyproline in Meat and Meat Products**. AOAC Internacional (1993).
- ⁵¹MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2 ed. 2014. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- ⁵²INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação sobre validação de métodos Analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, p. 31, 2016.
- ⁵³GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, p. 1-21, 1969.

- ⁵⁴BRUNS, R.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. de B. **Statistical Design - Chemometrics**. 1 ed Elsevier, 423 p., 2006.
- ⁵⁵SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.
- ⁵⁶SNEYDECOR G. W.; COCHRAN, W. G. **Factorial Experiments**. Statistical Methods. 1 ed. Iowa: Iowa State University Press, 1989.
- ⁵⁷POOLE, C. F. **The essence of chromatography**. 1. Ed. Elsevier, 925p, 2003.
- ⁵⁸DOLZAN, M. D. et al. A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection. **Analytical Methods**, v. 5, p. 6023-6029, 2013.
- ⁵⁹RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- ⁶⁰NOVOTNÝ, T.; GAŠ, B. Electrolysis phenomena in electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 41, p. 536-544, 2020.
- ⁶¹AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2016.
- ⁶²CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.
- ⁶³SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 398p., 2006.
- ⁶⁴GAUTIER, G.; COLOMBINI, M. P. GC–MS identification of proteins in wall painting samples: a fast clean-up procedure to remove copper-based pigment interferences. **Talanta**, v. 73, p. 95-102, 2007.
- ⁶⁵ANDREOTTI, A. al. Combined GC/MS analytical procedure for the characterization of glycerolipid, waxy, resinous, and proteinaceous materials in a unique paint microsample. **Analytical chemistry**, v. 78, p. 4490-4500, 2006.

APÊNDICE A. Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas de calibração com padronização interna.



Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE B. Resultados do teste F para avaliação de ajuste do modelo linear e significância da regressão linear da curva de calibração com padronização interna para os analitos.

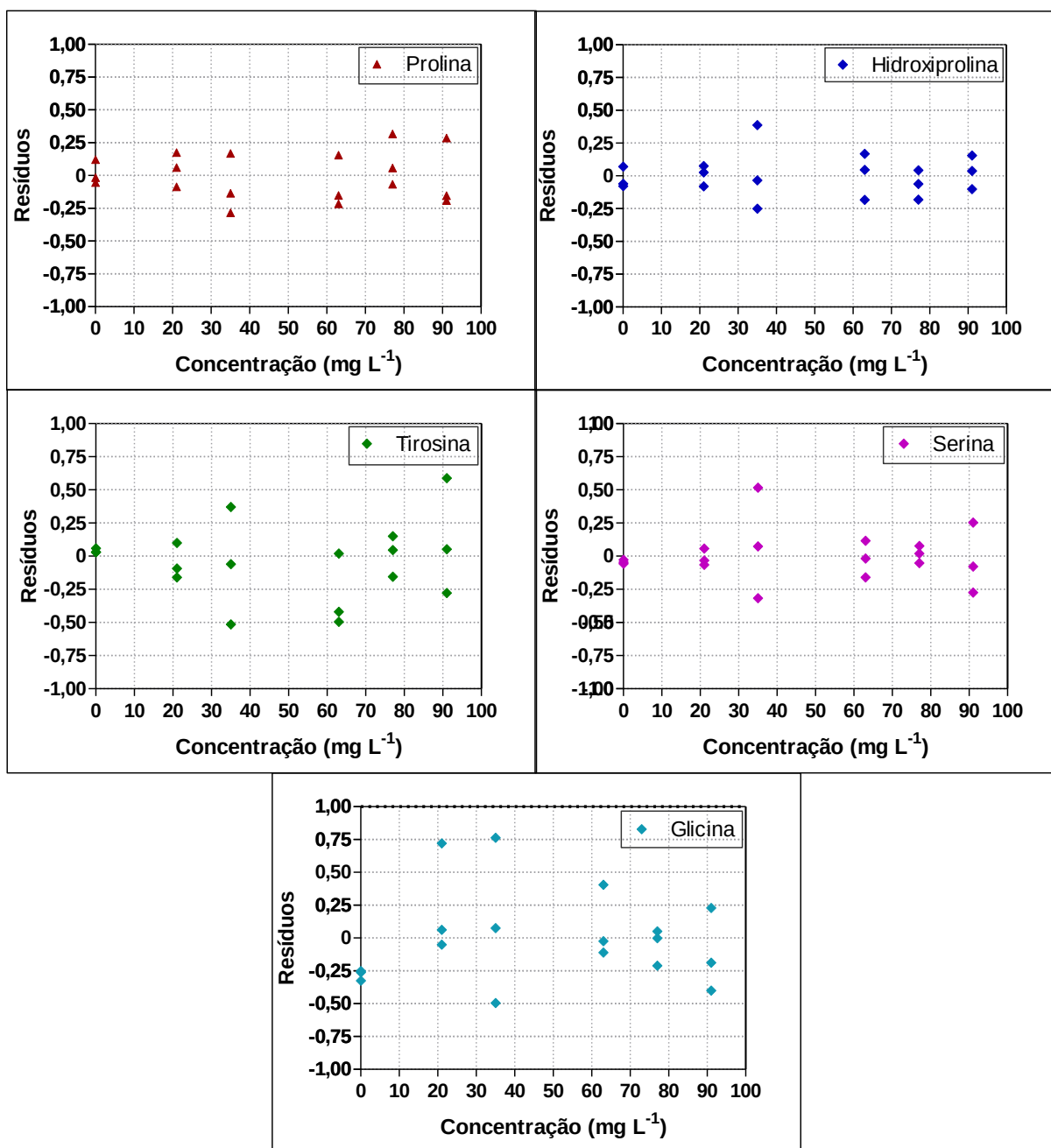
Analito	F _{Calc}	F _{Tab} ^a	Resultado teste de Hipótese ^b	F _{Calc}	F _{Tab} ^c	Resultado teste de Hipótese ^d
Gly	0,0193	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	543	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Hyp	0,00313	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	781	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Pro	0,0157	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	769	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Ser	0,00796	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	481	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Tyr	0,00206	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	489	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀

^a F_{Tabelado} (m-2, n-m; α) = 3,26 (4,12; 0,05). ^b H₀ = os resíduos possuem variância equivalente; H₁ = os resíduos não possuem variância equivalente. ^c F_{Tabelado} (m-2, n-m; α) = 4,49 (1,16; 0,05). ^d H₀ = não há correlação linear significativa entre as variáveis; H₁ = há correlação linear significativa entre as variáveis. Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE C. Resultados do teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos das regressões das curvas de calibração com padronização interna para os analitos.

Analito	W _{Calculado}	W _{Tabelado} ^a	Resultado teste de Hipótese ^b
Gly	0,940	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Hyp	0,950	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Pro	0,965	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Ser	0,963	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Tyr	0,971	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀

^a n = 18. ^b H₀ = os dados provêm de uma distribuição normal; H₁ = Os dados não provêm de uma distribuição normal. Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE D. Gráficos dos resíduos da regressão linear para as curvas de adição de padrão.

Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE E. Resultados do teste F para avaliação de ajuste do modelo linear e significância da regressão linear da curva de calibração com adição de padrão para os analitos.

Analito	F _{Calc}	F _{Tab} ^a	Resultado teste de Hipótese ^b	F _{Calc}	F _{Tab} ^c	Resultado teste de Hipótese ^d
Gly	0,0496	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	416	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Hyp	0,00888	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	2683	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Pro	0,0138	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	930	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Ser	0,0103	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	4581	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀
Tyr	0,0363	3,26	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	646	4,49	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀

^a F_{Tabelado} (m-2, n-m; α) = 3,26 (4,12; 0,05). ^b H₀ = os resíduos possuem variância equivalente; H₁ = os resíduos não possuem variância equivalente. ^c F_{Tabelado} (m-2, n-m; α) = 4,49 (1,16; 0,05). ^d H₀ = não há correlação linear significativa entre as variáveis; H₁ = há correlação linear significativa entre as variáveis. Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE F. Resultados do teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos das regressões das curvas de calibração com adição de padrão para os analitos.

Analito	W _{Calculado}	W _{Tabelado} ^a	Resultado teste de Hipótese ^b
Gly	0,961	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Hyp	0,951	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Pro	0,914	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Ser	0,940	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀
Tyr	0,946	0,897	W _{Calc} > W _{Tab} , aceita H ₀

^a n = 18. ^b H₀ = os dados provêm de uma distribuição normal; H₁ = Os dados não provêm de uma distribuição normal. Fonte: dos autores, 2022.

APÊNDICE G. Resultados dos testes F e t de Student para comparação das inclinações das curvas com padronização interna e por adição de padrão para os analitos.

Analito	F_{Calc}	F_{Tab}^a	Resultado teste de Hipótese^b	t_{Calc}	t_{Tab}^c	Resultado teste de Hipótese^d
Gly	2,03	19,0	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	1,27	2,78	t _{Calc} < t _{Tab} , aceita H ₀
Hyp	9,64	19,0	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	0,713	2,78	t _{Calc} < t _{Tab} , aceita H ₀
Pro	1,26	19,0	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	1,09	2,78	t _{Calc} < t _{Tab} , aceita H ₀
Ser	1,27	19,0	F _{Calc} < F _{Tab} , aceita H ₀	1,42	2,78	t _{Calc} < t _{Tab} , aceita H ₀
Tyr	67,9	19,0	F _{Calc} > F _{Tab} , rejeita H ₀	11,2	2,78	t _{Calc} > t _{Tab} , rejeita H ₀

^a F_{Tabelado} (2, 2; 0,05). ^b H₀ = valores possuem variância equivalente; H₁ = valores não possuem variância equivalente. ^c Para valores homogêneos t_{Tabelado} (4; 0,05) bicaudal; para valores heterogêneos t_{Tabelado} (4; 0,05) bicaudal. ^d H₀ = não há diferença significativa entre as variáveis; H₁ = há diferença significativa entre as variáveis. Fonte: dos autores, 2022.