



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

Victor Rodrigues Alves

Desenvolvimento de novo método por eletroforese capilar para a determinação do teor de colágeno em suplementos alimentares e investigação de fraudes em produtos cárneos cozidos adicionados de carne mecanicamente separada

Florianópolis

2024

Victor Rodrigues Alves

Desenvolvimento de novo método por eletroforese capilar para a determinação do teor de colágeno em suplementos alimentares e investigação de fraudes em produtos cárneos cozidos adicionados de carne mecanicamente separada

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química Analítica.

Orientador(a): Prof. Luciano Vitali, Dr.
Coorientador(a) Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Alves, Victor Rodrigues

Desenvolvimento de novo método por eletroforese capilar para a determinação do teor de colágeno em suplementos alimentares e investigação de fraudes em produtos cárneos cozidos adicionados de carne mecanicamente separada / Victor Rodrigues Alves ; orientador, Luciano Vitali, coorientador, Gustavo Amadeu Micke, 2024.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletroforese Capilar. 3. Colágeno. 4. Produtos cárneos. 5. Suplementos alimentares. I. Vitali, Luciano. II. Micke, Gustavo Amadeu. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Victor Rodrigues Alves

Desenvolvimento de novo método por eletroforese capilar para a determinação do teor de colágeno em suplementos alimentares e investigação de fraudes em produtos cárneos cozidos adicionados de carne mecanicamente separada

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 05 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Alessandra Vicenzi Jager, Dr^a.

Universidade de São Paulo - USP

Prof^a. Silvani Verruck, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof^a. Tatiane de Andrade Maranhão, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Química com especialização em Química Analítica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Luciano Vitali, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Edilma, por todo o incentivo, amor e torcida incondicional. Por sua dedicação incansável, insistência e cobrança, que me fizeram crescer e persistir. Por ressaltar que estaria ao meu lado, independente do desfecho desta jornada.

À Samantha, por trilhar cada minuto desta jornada. Trabalhar ao seu lado foi um privilégio, e dividir as alegrias e tristezas contigo foi enriquecedor. Agradeço por ficar comigo no laboratório, por dividir a bancada, por ensinar e por sempre apontar minhas qualidades, por auxiliar a abrir meus olhos para o lado positivo.

Ao Prof. Dr. Luciano Vitali, por compartilhar seu conhecimento e pelo privilégio de ser guiado para a eletroforese capilar sob sua condução. Pela disposição em contribuir e participar da nossa pesquisa e estar presente a cada etapa concluída. Pela paciência e por fazer cada reunião uma aula de humanidade e positividade. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Prof. Dr. Gustavo A. Micke, expressei meu agradecimento pelo aprendizado e pela confiança em disponibilizar a infraestrutura.

Ao Heitor Daguer pela disposição e motivação, por participar e compartilhar contatos e experiências que poderiam motivar a realização deste trabalho.

Ao Felipe de Oliveira e a Rafaela da Silva Barbosa pela dedicação, contribuição e compartilhamento de conhecimento ao fazerem parte deste trabalho.

A cada amigo do LabECC por partilharmos dificuldades, nos motivarmos e por serem uma fonte de inspiração e orgulho para mim. Especialmente, aos meus amigos Diogo, Carol, Alysson, Kheytyani, Mayara, Maria, Riani, Camila, Vinicius e Ana.

Aos profs. Adriana Gerola, Alexandre Parize, Eduardo Chaves e Luiz Madureira pela participação na banca de qualificação, e todas suas contribuições, correções e direcionamentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por proporcionar as condições para a minha formação. Aos profs. que contribuíram para a minha formação e ao esforço de todos para manter a excelência da instituição. Agradeço os servidores Andrezza e Henrique da secretaria do programa de pós-graduação em química pelo seu trabalho e suporte.

À Capes e ao INCT-Catálise, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Impulsionado pela indústria do bem-estar, o uso do colágeno como suplemento alimentar aumentou nos últimos anos. Embora não haja consenso, são divulgados benefícios estéticos e ortopédicos associados ao uso diário do colágeno em quantidades pré-estabelecidas. Pode haver alta concentração de colágeno em produtos cárneos, principalmente quando em sua composição contiver um ingrediente rico em tecido conjuntivo, a carne mecanicamente separada. Ambos os produtos mencionados requisitam de rigor no controle de qualidade e a avaliação do teor de colágeno pode evidenciar fraudes econômicas por disparidade das quantidades rotuladas para estes ingredientes. Todavia, os métodos mais disseminados para determinação de seu teor, o fazem pela derivatização da trans-4-hidroxi-L-prolina, um iminoácido não-cromóforo e específico ao colágeno. Há evidências que sua oxidação pode formar ácido pirrol-2-carboxílico, que possui a característica de absorver radiação na região do ultravioleta. Pretende-se neste estudo desenvolver métodos para quantificar ambos, por estratégias independentes, a fim de determinar o teor de colágeno, utilizando a eletroforese capilar e sem recorrer a derivatização. Para quantificar o ácido pirrol-2-carboxílico optou-se pela detecção direta e seu método foi desenvolvido e a separação observada. Porém os dados de reações sintéticas de oxidação não evidenciaram sua formação, inviabilizando a continuidade desta abordagem. Por outro lado, a determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina deu-se pelo desenvolvimento do método com detecção ultravioleta indireta, utilizando o eletrólito de corrida de pH 11,4 contendo 25 mmol L⁻¹ de histidina, 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 10 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina. Otimizações multivariadas, fracionária e Doehlert, auxiliaram na seleção do comprimento do capilar de 75 μm em 64 cm, tensão em 30 kV, a concentração de β-ciclodextrina em 10 mmol L⁻¹ e a temperatura de separação em 12,5°C. Amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico. Previamente a análise, os hidrolisados foram submetidos a reação com carbonato de estrôncio para limpeza da amostra por neutralização e precipitação simultânea. A validação demonstrou a detectabilidade (inferior a 2,0 mg L⁻¹), seletividade, linearidade, precisão (inferior a 7%) e exatidão (recuperações de 88 – 102%) do método. O método pontuou 86 na eco escala e 0,49 pela calculadora de verdor analítico (AGREE). O método foi aplicado a amostras reais de suplementos alimentares e produtos cárneos disponíveis no mercado nacional, demonstrando ser uma alternativa adequada ao controle de qualidade.

Palavras-chave: Colágeno; produtos cárneos; suplementos alimentares; eletroforese capilar.

ABSTRACT

Driven by the wellness industry, the use of collagen as a dietary supplement has increased in recent years. Although there is no consensus, aesthetic and orthopedic benefits associated with the daily use of collagen in pre-established quantities are reported. There may be a high concentration of collagen in meat products, especially when their composition contains an ingredient rich in connective tissue, such as the mechanically separated meat. Both products mentioned require strict quality control and the assessment of collagen content may reveal economic fraud due to disparity in the quantities labeled for these ingredients. However, the most widespread methods for determining its content do so by derivatizing trans-4-hydroxy-L-proline, a non-chromophore imino acid specific to collagen. There is evidence that its oxidation can form pyrrole-2-carboxylic acid, which has the characteristic of absorbing radiation in the ultraviolet region. The aim of this study is to develop methods to quantify both, using independent strategies, to determine the collagen content, using capillary electrophoresis and without resorting to derivatization. To quantify pyrrole-2-carboxylic acid, direct detection was chosen, and its method was developed, and the separation observed. However, data from synthetic oxidation reactions did not demonstrate its formation, making the continuation of this approach unfeasible. On the other hand, the determination of trans-4-hydroxy-L-proline was carried out through the development of a method with indirect ultraviolet detection, using a running electrolyte of pH 11.4 containing 25 mmol L⁻¹ of histidine, 180 mmol L⁻¹ of butylamine and 10 mmol L⁻¹ of β -cyclodextrin. Multivariate optimizations, fractional and Doehlert, helped in the selection of the capillary length of 75 μ m in 64 cm, voltage in 30 kV, the concentration of β -cyclodextrin and the separation temperature in 12.5°C. Samples were hydrolyzed with sulfuric acid. Prior to analysis, the hydrolysates were subjected to reaction with strontium carbonate to clean the sample by neutralization and simultaneous precipitation. Validation demonstrated the detectability (less than 2.0 mg L⁻¹), selectivity, linearity, precision (less than 7%) and accuracy (recoveries of 88 – 102%) of the method. The method scored 86 on the eco scale and 0.49 on the analytical greenness calculator (AGREE). The method was applied to real samples of food supplements and meat products available on the national market, demonstrating that it is a suitable alternative for quality control.

Keywords: Collagen; meat products; dietary supplements; capillary electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da configuração de tripla hélice da proteína colagênica destacando a estrutura cristalina do segmento Hyp-Pro-Gly e seus constituintes isolados em sua forma neutra, após ser submetido a hidrólise ácida.	23
Figura 2 – Processamento de carcaças de frango, via separadores industriais, sob baixa (esquerda) e alta pressão (direita) na obtenção de carne mecanicamente separada.	27
Figura 3 – Representação de uma desossadora de carne na extração de carne mecanicamente separada (CMS) e os limites estabelecidos pelas instruções normativas (IN) da legislação brasileira para seu uso nos principais produtos cárneos.	27
Figura 4 – Métodos e características da determinação de colágeno.	29
Figura 5 – Formação do ácido pirrol-2-carboxílico a partir da trans-4-hidroxi-L-prolina, sendo o ácido pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico um produto intermediário. A reação de oxidação resulta da ação de enzima L-oxidase apropriada do isômero do iminoácido.	31
Figura 6 – Diagrama representativo dos componentes básicos de um instrumento de eletroforese capilar com detecção na região do espectro ultravioleta.	35
Figura 7 – Representação da seção de um capilar de sílica fundida utilizado para separação em eletroforese capilar. A grande seta representa o sentido de migração do fluxo eletrosmótico que move os íons solvatados em direção ao cátodo.	37
Figura 8 – Mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF) em função do pH do eletrólito.	38
Figura 9 – Representação da formação do complexo de inclusão entre L-prolina e β -ciclodextrina.	47
Figura 10 – Descrição matemática da curva de mobilidade efetiva do ácido pirrol-2-carboxílico versus o pH pelo modelo sigmoidal de Boltzmann (A).	65
Figura 11 – Otimização das concentrações do contra-íon e co-íon. A concentração do contra-íon, TRIS, foi avaliada de 18 a 40 mmol L ⁻¹ , com o co-íon fixado em 15 mmol L ⁻¹ (A). A condição selecionada foi então fixada para a avaliação da concentração do co-íon, ácido láctico, de 16 a 36 mmol L ⁻¹ (B). Foram avaliados os parâmetros para o BGE como a força iônica, capacidade tamponante e o pH, além de variáveis para o analito como a mobilidade e EMD.	67

Figura 12 – Eletroferogramas de padrões observados por simulação (A) e análise real (B). Sinais referentes ao: triptofano, tirosina, cisteína, histidina e fenilalanina (*), ácidos clorogênico (IS, 1), ascórbico (2), sórbico (3), nicotínico (4) e pirrol-2-carboxílico (5); Experimental: capilar de sílica de 32 e 8,5 cm (50 μm d.i., 375 μm d.e.), polaridade negativa (-30 kV), injeção a -50 mbar por 5s e detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico e trishidroximetilamônio 20:40 mmol L⁻¹ pH 8,1.68

Figura 13 – Repetitividade em análises consecutivas (n = 50) para monitoramento do tempo de migração, em minutos, e área do ácido pirrol-2-carboxílico (analito) e do ácido clorogênico (padrão interno), além da normalização de ambos, acessada pela razão do valor da grandeza do analito pela do padrão interno. Condições de análise: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 8,5 cm (50 mm d.i., 375 mm d.e.), polaridade negativa, voltagem de separação -30 kV, injeção hidrodinâmica por pressão de -50 mbar por 5s, detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico 20 mmol L⁻¹ e trishidroximetilamônio 40 mmol L⁻¹ pH 8,2.....69

Figura 14 – Eletroferogramas respectivos ao método de eletroforese capilar de zona para monitorar a formação de ácido pirrol-2-carboxílico a partir da reação sintética de oxidação da trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) com cloramina-T (CAT). De cima para baixo constam os resultados para a análise da solução padrão de CAT, HYP, mistura reacional em pH 6,4, 4,0 e 2,0, todas após 20 min. O pH foi reduzido por adição de ácido perclórico. Condições de análise: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 8,5 cm (50 mm d.i., 375 mm d.e.), polaridade negativa, voltagem de separação -30 kV, injeção hidrodinâmica por pressão de -50 mbar por 5s, detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico 20 mmol L⁻¹ e trishidroximetilamônio 40 mmol L⁻¹ pH 8,2.70

Figura 15 - De cima para baixo estão apresentados cromatogramas eletrocinéticos micelares de uma mistura de marcadores de fluxo, micelar e um composto neutro, a cafeína. Em seguida, os padrões de ácido pirrol-2-carboxílico e pirrol individuais. E por fim, a mistura reacional em diferentes proporções e diluições. Condições de análise: capilar de 60 cm, 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.). Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e dodecilsulfato de sódio 100 mmol L⁻¹ em pH 9,0.....71

Figura 16 – Hidrolisado neutralizado e oxidação sem tampão no modo positivo (A) e no modo negativo (B). E comparativo entre a reação de oxidação em pH 2,0 (C) e o padrão de pirrol (D) no modo negativo de ionização.....72

Figura 17 – Curvas de mobilidade efetiva versus pH expressos para 20 aminoácidos e a trans-4-hidroxi-L-prolina (A). Ampliação para avaliação da região onde houve diferença de mobilidade (B).....	75
Figura 18 – Otimização das concentrações do co-íon, histidina, de 15 a 40 mmol L ⁻¹ . Contra-íon fixado em 180 mmol L ⁻¹ . Foram avaliados os parâmetros para o BGE como a força iônica, capacidade tamponante e o pH, além de variáveis para o analito como a mobilidade e EMD.	77
Figura 19 – Reprodução das condições otimizadas in silico. Eletroferograma simulado (A) e experimental (B). Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 µm i.d. e 375 µm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Temperatura de 23°C. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L ⁻¹ de histidina e 180 mmol L ⁻¹ de butilamina, pH 11,4.....	78
Figura 20 – Planejamento de experimentos para o desenvolvimento do método indireto. (A) Gráfico de Pareto (R ² = 0.992) a partir do fatorial fracionário (2 ⁴⁻¹) com dois níveis e quatro variáveis (temperatura, comprimento do capilar, concentração de β-ciclodextrina e tensão). (B) Metodologia de superfície de resposta Doehlert (R ² = 0.979) para duas variáveis em três níveis para β-ciclodextrina e cinco para temperatura. Para o cálculo do fator de resposta foi utilizada a equação: $RF = R_s \times H(HYP/IS)/tHYP$	80
Figura 21 – Eletroferogramas comparativos da separação da trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) dos aminoácidos interferentes a 20°C (A); contendo β-ciclodextrina (β-CD) e na mesma temperatura (B); sem β-CD e a 12,5 °C (C); contendo β-CD e a 12,5°C para somente os aminoácidos (D) e após a adição de HYP (E). Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 µm i.d. e 375 µm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L ⁻¹ de histidina e 180 mmol L ⁻¹ de butilamina, pH 11,4.....	82
Figura 22 – Sucessivas adições de sulfato de estrôncio (SrSO ₃) e as alterações na corrente (i) e no pH do hidrolisado de pó para bebidas.....	83
Figura 23 – Eletroferogramas do padrão aquoso 50 mg L ⁻¹ de trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) (A1, B1), inclusão dos aminoácidos (A2, B2), preparado para bebidas em pó E (A3), salsicha (B3), preparado para bebidas em pó A (A4), linguiça <i>bruhwürst</i> (B4). A mobilidade media do fluxo eletrosmótico foi de $44 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Legenda: 1 – L-	

prolina; 2 – CHES; 3 – L-triptofano; 4 – L-fenilalanina; 5 – L-leucina; 6 – L-isoleucina; 7 – MOPS; 8 – L-valina; 9 – HYP; 10 – L-metionina; 11 – L-alanina; 12 – L-glutamina; 13 – L-treonina; 14 – L-asparagina; 15 – L-serina.....85

Figura 24 – Eletroferogramas para as amostras de suplementos alimentares avaliadas pelo método proposto. As setas indicam o tempo de migração para a trans-4-hidroxi-L-prolina. Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 µm i.d. e 375 µm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L⁻¹ de histidina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 10 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina no pH 11,4.....89

Figura 25 – Eletroferogramas para amostras de produtos cárneos. As setas indicam o tempo de migração para a trans-4-hidroxi-L-prolina. Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 µm i.d. e 375 µm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L⁻¹ de histidina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 10 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina no pH 11,4.....90

Figura 26 – Arco em seções que representam os 12 princípios da química analítica verde para o método proposto (A) e o método oficial AOAC 990.26 (B). As cores verde, amarelo, vermelho e suas nuances representam, respectivamente, do excelente ao inadequado grau de verdor.92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Produtos cárneos e suplementos alimentares do mercado brasileiro e suas informações de embalagem e rotulagem sobre a principal fonte de colágeno58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos de separação em meio líquido na determinação de colágeno via 4-hidroxi-L-prolina em matrizes alimentícias	41
Tabela 2 – Estratégia de desenvolvimento de método multivariada (A) níveis dos fatores e contrastes utilizados para um planejamento fatorial fracionado de $2^{(4-1)}$ e (B) Metodologia de superfície de resposta Doehlert, ambos realizados em triplicata do ponto central.....	56
Tabela 3 – Performance analítica do método em termos de figuras de mérito.	86
Tabela 4 – Teor de colágeno (COL) e trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) em amostras de suplementos alimentares e produtos cárneos determinados pelo método proposto.	88
Tabela 5 – Descrição do procedimento de determinação do veredor do método pela utilização da eco escala.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ_e	Mobilidade efetiva
μ_{ef}	Mobilidade eletroforética
μ_{EOF}	Mobilidade do fluxo eletroosmótico
$^1\text{HNMR}$	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons, do inglês <i>proton nuclear magnetic resonance</i>
AccQ-Fluor	Derivatizante proprietário que atribui fluorescência
AGREE	Calculadora do verdor analítico, do inglês <i>analytical greenness calculator</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica
BGE	Eletrólito de corrida, do inglês <i>background electrolyte</i>
CD	Ciclodextrina
CD-CZE	Eletroforese capilar de zona assistida por ciclodextrina, do inglês <i>cyclodextrin assisted-capillary zone electrophoresis</i>
CD-EKC	Cromatografia eletrocínética assistida por ciclodextrina, do inglês <i>cyclodextrin assisted-electrokinetic chromatography</i>
CD-EKC-DAD	Eletrocromatografia assistida por ciclodextrina e detecção de arranjo de diodos, do inglês <i>cyclodextrin assisted-electrokinetic chromatography with diode array detector</i>
CE	Técnica ou instrumentação de Eletroforese capilar, do inglês <i>capillary electrophoresis</i>
CMS	Carne mecanicamente separada
COL	Colágeno
CV	Coefficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona, do inglês <i>capillary zone electrophoresis</i>
D	Enantiômero na conformação dextrogiro
d.e.	Diâmetro externo
DFT	Teoria de densidade funcional, do inglês <i>density functional theory</i>

d.i.	Diâmetro interno
DMAB	4-dimetilaminobenzaldeído
DMB	1,2-diamino-4,5-metilenodioxibenzeno
DOE	Planejamento de experimentos
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMD	Dispersão por eletromigração, do inglês <i>electromigration dispersion</i>
EURACHEM	Químicos Analíticos na Europa
F	Valor associado a teste estatístico de Sneydecor, para verificar diferença entre variâncias
F _{calc}	Valor da estatística F representativo aos dados experimentais
F _{crit}	Valor da estatística F representativo aos dados teóricos tabelados
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês <i>food and drug administration</i>
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GLY	L-Glicina
H ₀	Hipótese nula
H _{HYP/IS}	Razão de altura entre os sinais da trans-4-hidroxi-L-prolina e o padrão interno (IS)
HPAEC-FLD	Cromatografia líquida de troca ânionica com detecção amperométrica, do inglês <i>high performance anion exchange chromatography with fluorescence detection</i>
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca iônica de alta performance e detecção pulso-amperométrica, do inglês <i>high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>
HPLC-FLD	Cromatógrafo a líquido com detector de fluorescência do inglês <i>high performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>
HYP	4-trans-L-hidroxiprolina
ICOF-LED-IFD-CE	Eletroforese com detecção no interior do capilar de Fluorescência induzida em fibra ótica emissora de luz, do inglês <i>in-capillary optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection</i>
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IS	Padrão interno, do inglês, <i>internal standard</i>
L	Enântiômero na conformação levogira
LC-MS/MS	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
L _{det}	Comprimento do capilar até o detector, em centímetros
LIF	Fluorescência Induzida por Laser
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
L _{tot}	Comprimento do total do capilar, em centímetros
m	Massa
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MECK	Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês <i>micellar electrokinetic chromatography</i>
MECK-DAD	Electrocromatografia micelar com detecção de arranjo de diodos, do inglês <i>micellar electrokinetic chromatography with diode array detection</i>
MEKC-LIF	Electrocromatografia micelar com detecção de fluorescência induzida por luz, do inglês <i>micellar electrokinetic chromatography with light induced fluorescence</i>
MRM	Monitoramento de múltiplas reações, do inglês <i>multiple reaction monitoring</i>
n	Número de replicatas
NBD-Cl	7-cloro-4-nitro-benzofurano
NBD-F	Fluoro-4-nitro-benzofurano
p	Probabilidade estatística
P2C	Ácido pirrol-2-carboxílico
pH	Potencial hidrogeniônico
PRO	L-prolina
q	Carga
r	Raio iônico hidratado

R^2	Coeficiente de determinação resultante da linearização dos dados experimentais
REC	Recuperação, em percentual
RF	Fator de resposta dos planejamentos de experimentos, do inglês, <i>response factor</i>
R_s	Resolução entre sinais adjacentes em um eletroferograma
s	Desvio padrão amostral
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodesilsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
t	Quando isolado, representa a estatística t de Student, para verificação da diferença entre médias
T	Temperatura da região termostaticada do instrumento de eletroforese capilar, em graus celsius
t_{calc}	Valor da estatística t representativo aos dados experimentais
t_{crit}	Valor da estatística t representativo aos dados teóricos tabelados
t_{EOF}	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico (EOF), em minutos
t_{HYP}	Tempo de migração da trans-4-hidroxi-L-prolina, em minutos
TOF	Analizador de massas por tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
U	Tensão aplicada
UV	Radiação ultravioleta
W	Representa a estatística W para verificação da normalidade
W_{calc}	Valor da estatística F representativo aos dados experimentais
W_{crit}	Valor da estatística F representativo aos dados teóricos tabelados
x	Média aritmética dos dados amostrais
y_i	Observações
y_m	Média das observações
α	Grau de dissociação
β -CD	Beta-ciclodextrina
η	Viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	COLÁGENO E TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA.....	23
2.1.1	Colágeno na tecnologia de alimentos	24
2.1.1.1	<i>Suplementos alimentares</i>	25
2.1.1.2	<i>Carne mecanicamente separada</i>	26
2.2	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO.....	28
2.2.1	Hidrólise do colágeno para a análise de trans-4-hidroxi-L-prolina	30
2.2.2	Oxidação da trans-4-hidroxi-L-prolina	31
2.2.3	Métodos analíticos para acessar o teor de colágeno pela determinação de trans-4-hidroxi-L-prolina	32
2.3	ELETROFORESE CAPILAR.....	34
2.3.1	Eletroforese capilar na determinação de 4-trans-hidroxi-L-prolina para acessar o teor de colágeno	40
2.3.2	Detecção ultravioleta indireta por eletroforese capilar	44
2.3.3	β-ciclodextrina na eletroforese capilar	45
2.4	AVALIAÇÃO DO VERDOR DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3.2.1	Determinação do ácido 2-pirrolcarboxílico	49
3.2.2	Determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	51
4.2	INSTRUMENTAL.....	51
4.2.1	Instrumento de eletroforese capilar	51
4.2.2	Condições instrumentais para o do método de determinação do ácido pirrol-2-carboxílico por CZE-DAD	52
4.2.3	Condições instrumentais para execução do método de determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina por CD-CZE-DAD com detecção UV indireta	52
4.2.4	Instrumentação e condições do método comparativo para determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina por LC-MS/MS	53

4.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO E SUA APLICAÇÃO	53
4.3.1	Determinação do pKa e mobilidade do ácido pirrol-2-carboxílico	53
4.3.2	Otimizações <i>in silico</i> das condições de análise do ácido pirrol-2-carboxílico	54
4.3.3	Aplicação do método em amostras simulada e investigação dos produtos da reação	55
4.4	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	55
4.4.1	Estratégia <i>in silico</i> para seleção do pH, composição do BGE e padrão interno	55
4.4.2	Otimização da separação por análises multivariadas	56
4.5	AMOSTRAS DE PRODUTOS CÁRNEOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES	57
4.5.1	Procedimento de Hidrólise das amostras	59
4.5.2	Limpeza dos hidrolisados das amostras	59
4.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	59
5	RESULTADOS	63
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO	63
5.1.1	Determinação do pKa aparente e mobilidade do ácido pirrol-2-carboxílico	63
5.1.2	Otimizações <i>in silico</i> das condições de análise do ácido pirrol-2-carboxílico	65
5.1.3	Aplicação do método e investigação dos produtos da reação	69
5.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	74
5.2.1	Estratégia <i>in silico</i> para seleção do pH, composição do BGE e padrão interno	74
5.3	OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO COM ANÁLISE MULTIVARIADA	78
5.4	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA: HIDRÓLISE SEGUIDA DE PRECIPITAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO COM SULFATO DE ESTRÔNCIO	82

5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE COLÁGENO VIA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	84
5.6	ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E PRODUTOS CÁRNEOS	87
5.7	VERDOR DO MÉTODO PELA ECO-ESCALA E SOFTWARE AGREE E COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO COM A LITERATURA.....	90
6	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO EM FUNÇÃO DO PH	107
	APÊNDICE B – ESTATÍSTICA PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AVALIAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA DOS FATORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO DOEHLERT	109

1 INTRODUÇÃO

Alimento presente no cotidiano, a carne, é uma opção de relevância nutricional para a dieta, especialmente pelas vitaminas e proteínas que contêm. No setor produtivo, o Brasil destaca-se como uma referência mundial. Para a manutenção da oferta e por tratar-se de um produto perecível, são utilizadas estratégias de salga, defumação, cozimento, fermentação e incorporação de aditivos para ampliação de sua validade, o que resulta em uma nova classificação, a de produtos cárneos.

Participam da formulação deste tipo de alimento, tanto as porções musculares e as de menor valor agregado, visando o aproveitamento máximo do animal, como a pele, cartilagem etc. Os produtos cárneos cozidos, podem conter em sua composição a carne mecanicamente separada, que é obtida da remoção da carne de carcaças por maquinário específico. Sua composição contém alto percentual de tecidos conjuntivos, ricos em colágeno.

Investigações de fraudes e adulterações de produtos cárneos ficaram em evidência pela operação carne fraca, deflagrada pela polícia federal em 2017. Além de destacar práticas como o uso da carne de cabeça e carcaças na composição de salsichas. Embora a carne destas porções não seja vedada como ingrediente, caracteriza-se fraude econômica quando os limites estipulados pela legislação para a manufatura de cada produto cárneo são ultrapassados.

Recentemente, a expansão do mercado consumidor para o colágeno foi alavancada pela sua inserção em cosméticos e suplementação alimentar, motivada com a preocupação da população com estética, saúde e bem-estar, embora não haja consenso sobre a sua eficácia. Projeções até 2030 estimam crescimento de mais de 10% ao ano. Ainda assim, poucos são os estudos a fim de controlar o teor de colágeno empregado em suplementos alimentares. A necessidade reflete-se nas medidas adotadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que a alguns anos iniciou a regulação e estabeleceu diretrizes para ampliar o rigor de rotulagem.

Em alinhamento com o aumento da demanda mundial e a evolução dos mecanismos de fiscalização, recorrer a métodos analíticos modernos para poder estabelecer um controle rápido e eficiente, pode proporcionar maior segurança ao consumidor. O padrão ouro de controle do teor do colágeno segue sendo feito por método oficial colorimétrico, ao submeter a amostra a hidrólise, exposição a oxidante

e derivatização. A quantificação é realizada pela correlação da proteína colagênica com seu aminoácido específico, a trans-4-hidroxi-L-prolina livre.

Minimizar o número de etapas requeridas e retornar resultados com rapidez e baixo custo são desejáveis para análises de rotina. Alinhada as estas características, a eletroforese capilar consolidou-se como uma técnica de separação que requisita de poucos insumos para operação, baixa produção de resíduos, alta frequência analítica e uma gama de mecanismos de separação. Destaca-se a Eletroforese Capilar de Zona, que viabiliza a determinação de analitos cromóforos e não cromóforos. Quando estabelecidas condições para detecção ultravioleta indireta, uma nova proposição para a determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina, cuja absorvidade é ínfima, pode ser vislumbrada. Ainda, o possível produto de sua oxidação, o ácido pirrol-2-carboxílico, ainda não foi explorado como analito para esta proposição. A análise direta ampliaria a seletividade do método, uma vez que os aminoácidos não cromóforos, principais interferentes contidos nos hidrolisados, não exibiriam sinais.

Mesmo em separações com limitações de seletividade, como em análises de hidrolisados que contêm virtualmente todos os aminoácidos, são possíveis explorar parâmetros que a aprimoram significativamente. Desde experimentos *in silico*, a planejamento de experimentos e metodologias de superfícies de resposta podem ser utilizados para otimizar parâmetros operacionais, como o comprimento e o diâmetro do capilar, a diferença de potencial aplicada, a temperatura da região termostatizada e a implementação de aditivos, como as ciclodextrinas. Estas formam complexos de inclusão ou *host-guest*, que promove alteração da mobilidade diferencialmente dependendo da intensidade de interação das espécies com a ciclodextrina.

Ainda, alta concentração de ácidos nos hidrolisados, cuja característica reduz o pH e aumenta a força iônica do meio, promove condições incompatíveis com a análise por eletroforese capilar. A eliminação do próton e seu respectivo ânion, após a reação, pode ser concretizada simultaneamente e em etapa única por neutralização combinada com precipitação, ao implementar reagentes que combinados com as espécies do meio resultem em um composto de baixa solubilidade.

Embora seja consagrada como uma técnica de separação mais ecológica comparada as cromatográficas, métodos para avaliação da adequação com os princípios da química verde são uma métrica útil para avaliação de todo o procedimento. A eco escala e a calculadora do verdor analítico (AGREE) são exemplares que se consagraram por sistematizar esta estimativa e comparativo.

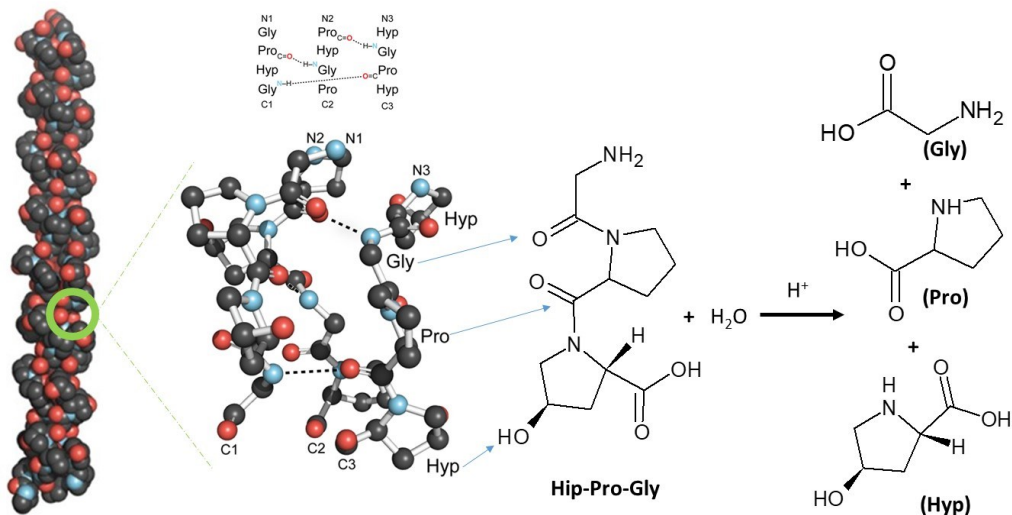
Sob tal motivação, este trabalho de tese de doutorado, cujos experimentos foram realizados em período pandêmico de COVID-19 entre 2020 e 2022, pretendeu abordar em capítulo único, a determinação do teor de colágeno por duas proposições diferentes: pela detecção ultravioleta indireta da trans-4-hidroxi-L-prolina e da detecção direta do ácido pirrol-2-carboxílico por eletroforese capilar de zona. Aliando menor número de etapas e mediando a química analítica verde. Objetivou-se contribuir com métodos analíticos voltados a análise de matrizes cárneas, bem como de suplementos alimentares a base de colágeno, cujo controle ainda apresenta deficiências. Por fim, os resultados foram publicados no periódico *Journal of Food Composition and Analysis* (Volume 122, Setembro 2023, 105431).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COLÁGENO E TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA

Dentre as proteínas animais, o colágeno é a mais abundante, representando aproximadamente 30% do total proteico de humanos (Wu *et al.*, 2019). Sua característica principal é ser uma proteína estrutural fibrosa encontrada em tecidos conectivos, incluindo ligamentos, tendões, cartilagens, pele, ossos e tecido intramuscular. O tamanho das moléculas de colágeno pode variar de tamanho e quantidade de aminoácidos constituintes, dependendo de sua origem. Sua massa média é em torno de $300.000 \text{ g mol}^{-1}$. Até o momento, foram identificadas vinte e nove estruturas de colágeno, sendo os tipos I (~90%) e II os mais comuns (Oliveira *et al.*, 2021; Shoulders e Raines, 2009). A representação estrutural de um segmento de colágeno apresenta-se na Figura 1.

Figura 1 – Representação da configuração de tripla hélice da proteína colagênica destacando a estrutura cristalina do segmento Hyp-Pro-Gly e seus constituintes isolados em sua forma neutra, após ser submetido a hidrólise ácida.



Fonte: Adaptado de (Shoulders e Raines, 2009).

O colágeno está organizado tridimensionalmente como uma tripla hélice formada por três cadeias polipeptídicas na conformação alfa, paralelas e entrelaçadas entre si. As ligações entre moléculas de colágeno são feitas com os resíduos de aminoácidos de forma cruzada e por ligações de hidrogênio (Oliveira *et al.*, 2021). Por exemplo, o colágeno de tipo I é um heterotrímero, composto por duas cadeias de

subunidades $\text{col}\alpha 1$ e uma $\text{col}\alpha 2$ interligadas (Bielajew, Hu e Athanasiou, 2021). Devido a esta disposição característica, são evidentes a resistência mecânica, estabilidade e baixa solubilidade em água. Os resíduos de aminoácidos predominantes nas estruturas colagênicas são a L-glicina (GLY, 23-33%), L-prolina (PRO, 14-16%) e trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP, 10-14%), sendo que as proporções destes variam de acordo com o tecido, organismo e tipo de colágeno. Sua sequência é caracterizada por repetições na ordem GLY-PRO-X e GLY-X-HYP, em que X pode ser qualquer um dos aminoácidos mencionados (Kusebauch *et al.*, 2006).

Neste contexto, o colágeno diferencia-se de outras proteínas por conter um aminoácido específico e não proteinogênico, a HYP. Resultante da hidroxilação pós-traducional da L-prolina pela prolinil-hidroxilase sob presença de ácido ascórbico (Lehninger, Nelson e Cox, 2009; Shoulders e Raines, 2009). A HYP tem caráter polar; baixa absorvidade molar; zwitterionica com pK_a de 1,8 e 9,6, respectivamente, aos grupos carboxila e imina; solúvel em água (500 mg mL^{-1} a 20°C); fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$; massa molar de 131,13 g mol^{-1} e log K_{ow} igual a -3,17 (Merck, 2018).

A forma prevalente da HYP no colágeno contém a hidroxila na posição 4 do anel pirrólico, de proporção 100:1 em relação a L-3-hidroxi-prolina, segunda estrutura mais abundante (Hu, He e Wu, 2022). Os dois átomos de carbono quirais propiciam a existência de 4 estereoisômeros: trans-4-hidroxi-L-prolina, trans-4-hidroxi-D-prolina, cis-4-hidroxi-L-prolina e cis-4-hidroxi-D-prolina (Bernardo-Bermejo *et al.*, 2023). As ligações peptídicas do colágeno estão dispostas na conformação trans, o que viabiliza a dobra em tripla hélice (Bernardo-Bermejo *et al.*, 2023; Chu, Evans e Zeece, 1997). Também é classificada como levógira (L) por herdar a conformação da PRO na biogênese do colágeno (Kusebauch *et al.*, 2006; Shoulders e Raines, 2009). A conformação dextrogira (D) pode ocorrer em aminoácidos devido a processos industriais, fermentação, variações de pH, etc. O isômero D em produtos de origem animal, como carnes e leite, ocorre em baixa concentração (Marccone *et al.*, 2020).

2.1.1 Colágeno na tecnologia de alimentos

O colágeno é utilizado na tecnologia de processamento alimentar, em formulações de bebidas lácteas, molhos, condimentos, suplementos alimentares, produtos cárneos etc. Na indústria alimentícia, as proteínas colagênicas são utilizadas

na elaboração da gelatina e do colágeno hidrolisado. A gelatina é caracterizada como “o produto obtido por hidrólise térmica, química ou enzimática, ou a combinação desses processos, da proteína colagênica, presente em cartilagens, tendões, peles, aparas ou ossos, das diferentes espécies animais, seguida de sua purificação, filtração, esterilização, concentração e secagem” (Brasil, 2021).

A ligação cruzada (do inglês, *cross-link*) entre os três peptídeos formadores das fibras de colágeno é enfraquecida por hidrólise. O desnovelar da estrutura resulta na formação de tiras individuais, mais solúveis em água. Com o abaixamento da temperatura, a reorganização de uma nova rede tridimensional capaz de reter água, gera estruturas gelatinosas em dimensões coloidais (Feiner, 2006). Esta característica amplia seu uso como aditivo alimentar, com emprego como emulsificante, estabilizante, espessante, e gelificante, cuja função, respectivamente, é a de propiciar a uniformidade de duas ou mais fases ou dispersões imiscíveis, aumentar a viscosidade de um alimento e conferir textura, quando aplicado em *quantum satis* nas formulações de bebidas lácteas, molhos, condimentos, etc. (Brasil, 2023).

Destaca-se a seguir a ingestão de colágeno como suplemento alimentar, cujas aplicações estão em ascensão econômica, impulsionada por alegações de benefícios para o bem-estar e saúde humana e animal (Markets, 2022). Seu consumo está também atrelado a produtos cárneos ricos no ingrediente popularmente conhecido como carne mecanicamente separada (CMS).

2.1.1.1 Suplementos alimentares

Diversas formas de colágeno estão disponíveis nos suplementos alimentares. Os principais são o colágeno hidrolisado (tipo I), colágeno não desnaturado (tipo II) e peptídeos bioativos de colágeno. São frequentemente comercializados em cápsulas, géis e preparado para bebidas em pó. O mercado global de colágeno está avaliado em 9,12 bilhões de dólares com expectativa de crescimento anual de 10,2% entre 2023 e 2030. As principais categorias comerciais que representam este cenário são as gelatinas, colágenos sintéticos e naturais, hidrolisados e nativos. O crescimento de consumo foi atribuído ao aumento da demanda por suplementação com o *marketing* voltados a beleza e saúde e dores articulares. O maior interesse do consumidor pode estar associado a preocupação com a imunidade após o período pandêmico da Covid-19 e o esforço e investimento em bem-estar (Grand View Research, 2022). A eficácia

da suplementação de colágeno em tratamentos dermatológicos e ortopédicos ainda não é um consenso. No entanto, alguns relatos indicam benefícios para cabelos e unhas, na cicatrização, degeneração tecidual, antienvhecimento da pele (Hao *et al.*, 2022; Hexsel *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

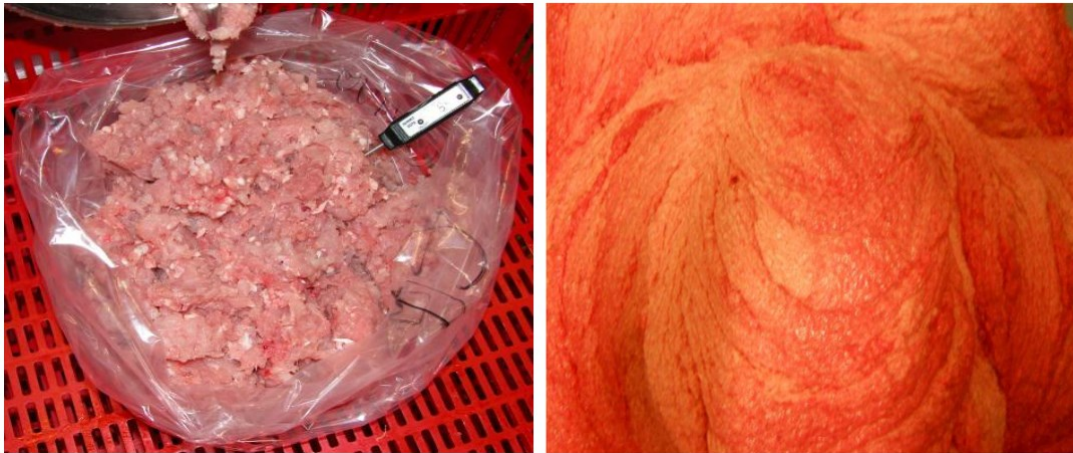
A Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) não regula o colágeno em suplementos alimentares. No entanto, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece diretrizes para o colágeno em suplementos alimentares (Brasil, 2018). Assim, quando ingerido acima da recomendação quantidade mínima diária, de 8,4 g, o colágeno hidrolisado pode ser classificado como uma fonte de suplementação proteica para adultos. A formulação individual de colágeno não desnaturado do tipo II ou em combinação com o colágeno hidrolisado de aves, são consideradas substâncias bioativas, como por exemplo, os peptídeos bioativos de colágeno. Segundo a ANVISA, a quantidade de ingestão diária de colágeno permitida depende de seu tipo: no caso do colágeno não desnaturado do tipo II, a faixa preconizada é de 1,2 mg a 8,4 mg; para o colágeno total, a variação é de 10 mg a um máximo de 70 mg (Brasil, 2020).

Declaração rotulada como: "o colágeno não desnaturado do tipo II auxilia a manutenção da função articular" são permitidas em suplementos alimentares que atendam aos critérios mínimos supracitados. Alegações de benefícios para a beleza da pele são restritas aos peptídeos bioativos do colágeno hidrolisado, de massa molar média de 2 kDa, em ingestão oral diária de 2,5 g. Ainda, produtos como pós para preparação de bebidas que contenham colágeno de tipo I e tipo II como ingrediente, também são regulamentados como suplementos alimentares (Brasil, 2022b).

2.1.1.2 *Carne mecanicamente separada*

A CMS é um dos ingredientes majoritários de alguns produtos cárneos. É rica em tecidos conjuntivos, por isso contém alta concentração de colágeno. Por definição é "o produto obtido da remoção da carne dos ossos que a sustentam, após a desossa de carcaças de aves, de bovinos, de suínos ou de outras espécies autorizadas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), utilizados meios mecânicos que provocam a perda ou modificação da estrutura das fibras musculares". É vedado o uso de pés, cabeças e patas (Brasil, 2017). Os tipos de processamentos podem ser visualizados na Figura 2.

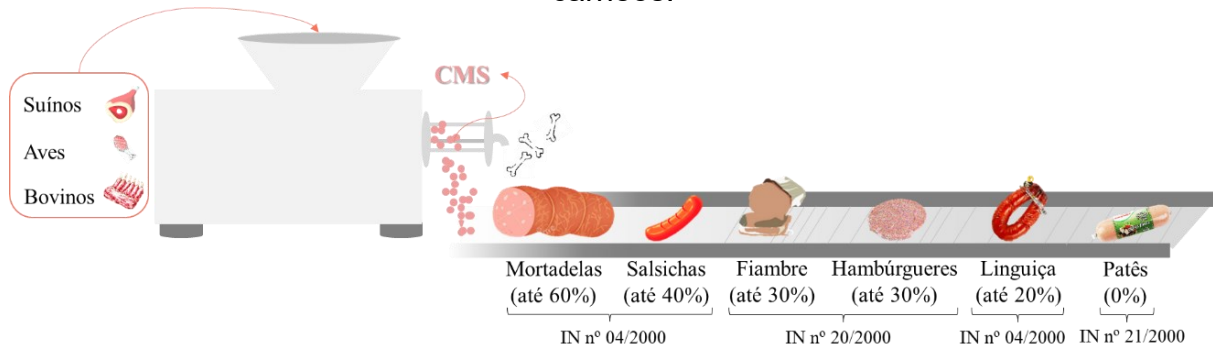
Figura 2 – Processamento de carcaças de frango, via separadores industriais, sob baixa (esquerda) e alta pressão (direita) na obtenção de carne mecanicamente separada.



Fonte: retirado de EFSA (2013).

A CMS assemelha-se a uma pasta e a carne triturada, respectivamente, para a de tipo 2 e 1, quando obtidas sob baixa e alta pressão. Podem ou não conter partículas de ossos inferiores a 1 milímetro. Não deve exceder 1000 partes por milhão de cálcio, no tipo 1 (James, Purnell e James, 2013). O processo gera ruptura celular, desnaturação proteica, e aumento de grupos heme livres, comprometendo cor, sabor e perecibilidade (Pereira *et al.*, 2011). Comparada a carne, há menos aminoácidos essenciais e mais lipídeos, em média 20% mais colesterol. São mais abundantes, o colágeno advindo das imediações dos ossos, minerais como o cálcio e fósforo (Shahidi e Synowiecki, 1993; Toldrá, 2017). São aplicadas na composição dos produtos industrializados triturados e embutidos (Efsa, 2013). Os limites máximos brasileiros para a CMS em produtos cárneos estão representados na Figura 3.

Figura 3 – Representação de uma desossadora de carne na extração de carne mecanicamente separada (CMS) e os limites estabelecidos pelas instruções normativas (IN) da legislação brasileira para seu uso nos principais produtos cárneos.



Fonte: de autoria própria.

A legislação brasileira estabelece limite máximo de CMS nas formulações, ao estipular valor individual para cada produto cárneo. Excetua-se o uso de CMS em produtos cárneos frescos, por exemplo as linguiças toscanas. Nas salsichas tipo Viena e Frankfurt, os limites são de 40% (m/m). Para mortadelas há variação de 20% a 60% (m/m) dependendo de sua classificação. Nas linguiças calabresa, portuguesa e paio é de 20% (m/m) (Brasil, 2000a). Em fiambres e hambúrgueres é de até 30% (m/m) (Brasil, 2000b). E em patês não há descrição de CMS como ingrediente (Brasil, 2000c). Acima do limite regulatório configura-se a adulteração da qualidade, o que se enquadra em fraude econômica, pela substituição da carne por um insumo de menor valor (Sentandreu e Sentandreu, 2014). Com isso, faz-se necessário a fiscalização por métodos capazes de reportar resultados em tempo compatível com o aumento da produção alimentícia.

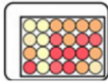
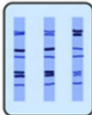
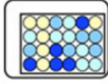
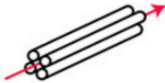

2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO

A complexidade e diversidade das estruturas das proteínas colagênicas dificultam o desenvolvimento de metodologias que as detectem com seletividade, sensibilidade e custo-benefício (Bielajew, Hu e Athanasiou, 2020). Durante a extração, os colágenos nativos são expostos a condições que podem levá-los à degradação (Valcarcel *et al.*, 2021). Adicionalmente, a falta de métodos candidatos que atendessem aos requisitos mínimos da Associação Oficial de Química Analítica Oficiais (AOAC), para determinar o colágeno nativo e hidrolisados de tipos I, II e III, retratam o desafio analítico (AOAC International, 2023; Ishaq *et al.*, 2016). Mesmo neste cenário, historicamente algumas abordagens se destacaram e suas características estão resumidas na Figura 4.

O estado da arte em termos de quantificação e tipificação do colágeno foi alcançado com a proteômica “*targeted*” e “*bottom-up*”, utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e de alta resolução com tempo de voo (TOF). Parâmetros simultâneos podem ser obtidos após a hidrólise com tripsina. Desde o teor de HYP e marcadores específicos de cada tipo de colágeno, e até os peptídeos respectivos a ligação cruzada das fibras colagênicas. As análises contam com criterioso desenvolvimento, auxílio de banco de dados e simulações *in silico* para triagem de fragmentos únicos a matriz, além de

desenvolvimento específico de padrões de peptídeos para serem utilizados na quantificação (Bielajew, Hu e Athanasiou, 2021; Deng *et al.*, 2023).

Figura 4 – Métodos e características da determinação de colágeno.

Métodos de quantificação de colágeno e de seus subtipos	
 Ensaio por hidroxiprolina	<ul style="list-style-type: none"> + Padrão Ouro + Econômico - Não determina subtipos - Resultados imprecisos
 Densitometria SDS-PAGE	<ul style="list-style-type: none"> + Econômico - Requisita fortes desnaturantes - Semi-quantitativo
 ELISA	<ul style="list-style-type: none"> + Alta sensibilidade - Custo elevado - Muitos anticorpos indisponíveis
 Proteômica "targeted"	<ul style="list-style-type: none"> + Alta sensibilidade + Automatização - Instrumentação cara e complexa - Métodos subdesenvolvidos
 Proteômica "bottom-up"	<ul style="list-style-type: none"> + Quant. simultânea dos subtipos + Baixo tempo do operador - Instrumentação cara e complexa - Longos métodos cromatográficos

Fonte: traduzido de Bielajew; Hu; Athanasiou (2020).

Outra estratégia importante na análise quantitativa do colágeno é o ensaio imunoenzimático (ELISA), que depende da disponibilidade e barreira de alto custo para a produção e aquisição de anticorpos para cada tipo de colágeno. Além disso, a tipificação se torna inviável em amostras que contenham mais do que um tipo de colágeno. Por outro lado, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) analisa proteínas pela separação por tamanho e carga. Para aplicações de quantificação direta do colágeno, os métodos que utilizam desta técnica apresentam restrições devido ao comportamento eletroforético atípico do colágeno, por sua estrutura conter alta concentração de cargas negativas. Além da dificuldade de preparação e reprodutibilidade do sistema em gel, bem como o tempo para sua confecção, considerando análises rotineiras (Bielajew, Hu e Athanasiou, 2021).

Embora a abordagem pela determinação de HYP proporcione apenas o teor total de colágeno, tal medida é considerada suficiente para a maioria das abordagens

(Bielajew, Hu e Athanasiou, 2020). Além disso, estratégias modernas podem incrementar ainda mais características positivas ao procedimento clássico, ao minimizar o tempo requerido do operador e o número de etapas obrigatórias à análise. As especificidades deste tipo de análise serão abordadas a seguir.

2.2.1 Hidrólise do colágeno para a análise de trans-4-hidroxi-L-prolina

A hidrólise proteica se disseminou com o propósito de expor a amostra a condições que causam a ruptura das ligações peptídicas para resultar em aminoácidos ou peptídeos mais simples. Após a clivagem, a hidrólise tem como característica deixar prótons ou hidroxilas (H^+ , OH^-) compondo os produtos da reação (Lehninger, Nelson e Cox, 2009). Abordagens catalisadas em meio ácido sob exposição a aquecimento e longos períodos são as mais consolidadas (Kolar, 1990).

O procedimento de hidrólise mais bem estabelecido e replicado para determinação de colágeno em carnes e produtos cárneos é o reportado pelo método AOAC 990.26. Inicialmente, para obter a HYP livre, faz-se etapa de hidrólise de 4 g de amostras em ácido sulfúrico ($3,5 \text{ mol L}^{-1}$) a 105°C por 16 horas. O hidrolisado é submetido a oxidação com tosilcloroamida (20 min.) e posterior derivatização com o reagente de Ehrlich, a 4-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), a 60°C por 15 min. Por fim, a concentração encontrada de HYP é expressa em g/100g (KOLAR, 1990).

Métodos de menor amplitude de escopo amostral retornaram performance similar para a quantificação da HYP em condições e instrumentações mais modernas. Por exemplo, a hidrólise de salames, mortadelas e massas prontas em ácido clorídrico 6 mol L^{-1} por micro-ondas, foi realizada em tempo de 20 min, operando com controle de potência, pressão e temperatura de ciclos (Messia *et al.*, 2008). Bem como o procedimento realizado em autoclave a 120°C que levou 40 minutos (Lin e Kuan, 2010). Por procedimento catalisado em meio alcalino, empregando hidróxido de sódio, foi obtido resultado semelhante ao método clássico com 30 mg de amostras de salsichas e fígado, em apenas 40 minutos (Silva, Da, Spinelli e Rodrigues, 2015).

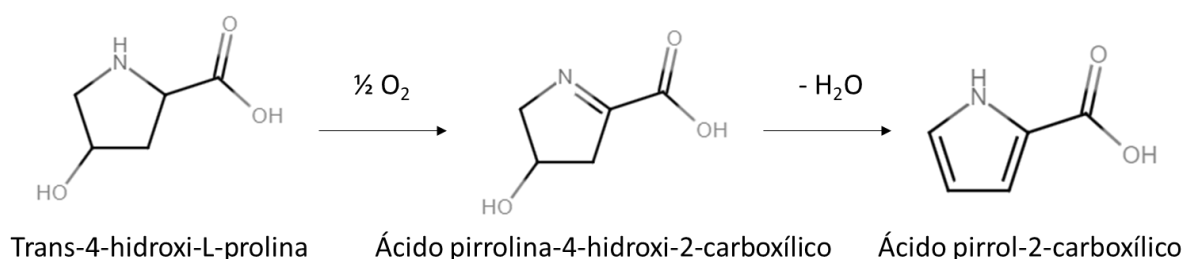
A reação de oxidação utilizada pelo método oficial da AOAC, submete ainda o hidrolisado a cloramina-T, após a hidrólise, pois assim garante-se maior especificidade e regioseletividade para entrada do grupo derivatizante na molécula da HYP e realizar a detecção espectrofotométrica.

2.2.2 Oxidação da trans-4-hidroxi-L-prolina

Por não possuir em sua estrutura uma ampla conjugação de elétrons, é observada para a HYP um ínfimo valor de coeficiente de absorvidade molar. Comparativamente, a detecção de aminoácidos cromóforos, como o triptofano, tirosina, histidina, fenilalanina e cisteína, possuem vantagens importantes para uma determinação seletiva e com menor número de etapas de preparo da amostra. Todavia, o método espectrofotométrico clássico contornou esta limitação da HYP realizando etapa de oxidação para derivatizá-la seletivamente (Kolar, 1990). Nesta reação, o anel pirrolidínico hidroxilado é oxidado, para dirigir a entrada da molécula cromófora ou fluorófora, preservando o analito em uma forma de maior estabilidade.

A tosilcloramina é um reagente com característica oxidante devido a liberação de hipoclorito quando em solução. Muitos são os trabalhos que referenciam o ácido 2-pirrolcarboxílico (P2C) como o produto da reação de oxidação da HYP in-vivo, ou pela ação da tosilcloroamina, ou quando com outros oxidantes (Peterkofsky e Prockop, 1962; Prockop, Udenfriend e Lindstedt, 1961). Estudos da reação da HYP, por rota enzimática ou não-enzimática, utilizando enzimas renais ou peróxido de hidrogênio com sulfato de cobre em meio alcalino, demonstraram evidências de formação do P2C (Radhakrishnan e Meister, 1957). Cissell et al. (2017) também se refere ao P2C como o produto oxidativo da HYP quando exposta a tosilcloroamina. In vivo, Heacock e Adams (1974) reportaram a excreção de P2C em urina humana, sendo a provável fonte da condição de alta HYP livre no sangue. A Figura 5 exemplifica a reação de oxidação da HYP para gerar o intermediário ácido pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico e, após desidratação gera o P2C.

Figura 5 – Formação do ácido pirrol-2-carboxílico a partir da trans-4-hidroxi-L-prolina, sendo o ácido pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico um produto intermediário. A reação de oxidação resulta da ação de enzima L-oxidase apropriada do isômero do iminoácido.



Fonte: adaptado de Heacock e Adams (1974).

Em contrapartida, trabalhos mencionam o pirrol como o principal intermediário da reação de oxidação com a tosilcloramina (Jamall, Finelli e Que Hee, 1981; Tarnutzer *et al.*, 2022). Todavia, este é um composto que sofre rápida polimerização oxidativa em contato com o oxigênio atmosférico, evidenciado pelo seu escurecimento, resultando em um material de cor marrom a preta (Tan e Ghandi, 2013). Devido a esta característica de instabilidade, a determinação do pirrol para posterior correlação com o teor de colágeno em matrizes complexas poderia resultar em resultados imprecisos.

Embora o P2C tenha características que viabilizem mais facilmente a sua detecção, em comparação a HYP, não foram encontrados registros de métodos modernos que o estudem para correlacionando-o com o teor de colágeno. Um método que viabilize sua análise poderia proporcionar a diminuição do número de etapas em relação aos métodos clássicos, contribuindo também para aprimorar a seletividade e frequência analítica. São maiores as incidências de métodos para a determinação do teor de colágeno pela relação com a HYP. Esta tem sido estudada e abordada com esta finalidade por diversos métodos analíticos modernos.

2.2.3 Métodos analíticos para acessar o teor de colágeno pela determinação de trans-4-hidroxi-L-prolina

A correlação da concentração da HYP para a quantificação do teor de colágeno já foi reportada em muitas matrizes alimentícias (Messia *et al.*, 2008; Vallejo-Cordoba *et al.*, 2005; Yuswan *et al.*, 2021). O teor de colágeno pode ser acessado quando se assume que o nitrogênio da amostra seja advindo de aminoácidos, que em média correspondem a 16% do total do colágeno ($1 \div 0.16 = 6,25$). Sendo de 6,25, o fator nitrogênio-proteína, que é o estipulado para produtos cárneos, estima-se que o tecido conectivo contenha 12,5% de HYP (Instituto Adolfo Lutz, 2008; Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2004; Wu *et al.*, 2019). Por fim, o teor de colágeno a partir da concentração de HYP se dá por um fator de 8 ($12,5 \times 8 = 100\%$) (Kolar, 1990).

Consta no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal do MAPA, bem como no livro de Métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz a determinação de colágeno em produtos cárneos, pela, já mencionada, AOAC 990.26 (Brasil, 2022a; Instituto Adolfo Lutz, 2008; Kolar,

1990). Pela publicação original deste trabalho foram encontrados valores de 0,1 a 4,0 % de HYP em amostras de menor expressão de colágeno como o lombo, *falukorv* (salsicha sueca de carne e farinha de batata), linguiça de sangue, presunto e, o mais expressivo, o revestimento externo de presuntos.

Além do método AOAC, em tempo de análise reduzido, a detecção espectrométrica na região do visível do derivado de HYP com 1,2-diamino-4,5-metilenodioxibenzeno (DMB), após hidrólise de amostras de salsicha e fígado suíno, foram encontrados 13,6 e 8,3% de colágeno, respectivamente (Silva, Da, Spinelli e Rodrigues, 2015). Lin e Kuan (2010) desenvolveram um kit de microplacas de 48 poços para o monitoramento do mesmo derivado de DMB por ELISA, em 550 nm. O teor de colágeno variou de 0,7% a 8,3% em cérebro, rim, fígado, músculo, coração, testículos, pulmão e orelha de ratos.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) foi a técnica com maior incidência na literatura para determinação de HYP. Yuswan *et al.* (2021) utilizaram a detecção de fluorescência de um derivado de HYP (AccQ-Fluor®) para determinar o conteúdo de colágeno em pele, carne, gelatina e alimentos de origem vegetal destinados a dietas muçulmanas, judaicas, hindus, veganas e vegetarianas, a fim de mitigar conflitos com suas premissas religiosas e escolhas dietéticas. Além disso, um derivado de fluorescência de HYP e PRO com 7-cloro-4-nitro-benzofurano (NBD-Cl) foi usado para quantificar colágeno em amostras de carne e derivados como a mortadela bologna (2,8 a 16,2 mg g⁻¹), pele de porco (38,9 mg g⁻¹) e gelatina de colágeno (195,5 mg g⁻¹) usando também a cromatografia em fase reversa (Vázquez-Ortiz, Morón-Fuenmayor e González-Méndez, 2004).

A etapa de derivatização mandatória é um ponto comum aos métodos, aumentando os custos, fontes de erros e a morosidade na rotina de análises (Sajid e Płotka-Wasyłka, 2022). Métodos que contornam esta obrigatoriedade também podem ser encontrados na literatura. Um método eletroquímico relatou o uso de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de ouro depositadas para quantificar HYP em tendão de Aquiles e urina humana por voltametria cíclica (Durairaj, Sidhureddy e Chen, 2020). Uma alternativa não destrutiva e de análise direta foi realizada por correlação da espectroscopia Raman, de infravermelho próximo e de fluorescência para determinar o teor de colágeno em 112 amostras simuladas contendo desde o aditivo de colágeno emulsificante, a gordura, carne moída, cartilagem e subprodutos da indústria cárnea medidos como teor de HYP de 0,1 a 3,3% para bifes bovinos e 0,4

a 1,4% para amostras de aves. Neste trabalho foram reportadas limitações nas regressões lineares, em termos dos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,81$ a $0,94$) (Monago-Maraña *et al.*, 2021).

Também isentas da etapa de derivatização, instrumentações que alcançam maior seletividade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequenciais (LC-MS/MS) com ionização por electrospray (ESI) seguida pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), foi combinada com cromatografia em fase reversa para a detecção direta de HYP em amostras de carne. O autor faz ressalvas para o confundimento entre as massas dos isômeros de HYP e os aminoácidos leucina e isoleucina, embora em relação ao analito estes últimos são resolvidos cromatograficamente (Colgrave, Allingham e Jones, 2008). A cromatografia de troca iônica de alta performance e detecção pulso-amperométrica (HPAEC-PAD) também foi usada para quantificar diretamente HYP como uma estimativa de colágeno, em amostras de mortadela e recheios de massas típicas italianas, que retornaram de 1,8 a 2,9% e 1,1 a 4,6% para esta proteína, respectivamente. A complexidade dos hidrolisados da amostra foi evidenciada por cromatogramas ricos em sinais de aminoácidos, porém com baixa resolução (Messia *et al.*, 2008).

Os métodos com maior especificidade e que contornam a etapa de derivatização envolvem instrumentação com alto custo de aquisição e manutenção, dispêndio de solventes e de produção de resíduos elevada, o que pode não ser atrativo para análises de rotina. Como alternativa aos métodos propostos, a eletroforese capilar (CE) conta com uma grande amplitude de modalidades a serem exploradas para esta aplicação, além de estratégias promissoras para o desenvolvimento de alternativas novas para a quantificação de colágeno via determinação do P2C ou sem derivatizar a HYP em matrizes complexas.

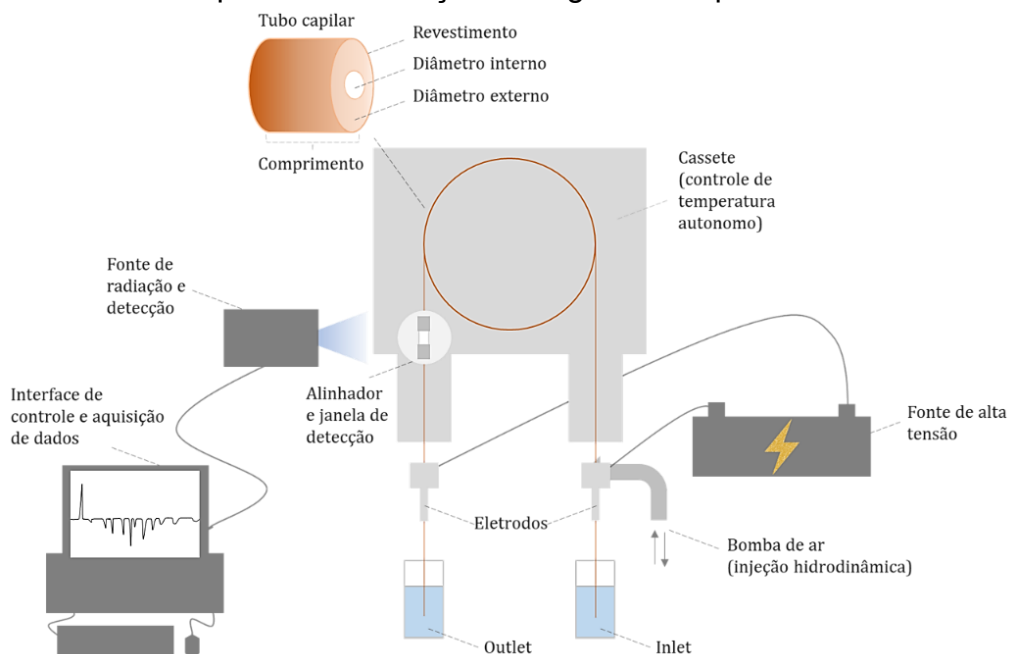
2.3 ELETROFORESE CAPILAR

A CE atingiu sua maturidade, especialmente por possuir mais de 30 anos de desenvolvimento e alcançar a marca de 203.142 publicações nas mais diversas áreas do conhecimento (Palmlblad, Eck, van e Bergquist, 2023). Sua consolidação como ferramenta de investigação e quantificação está atrelada as atrativas vantagens como técnica de separação, pois apresenta versatilidade, economia, alta frequência analítica e baixo impacto ambiental (Schepdael, Van, 2023).

O princípio de separação segrega as espécies por suas mobilidades eletroforéticas frente a ação de um campo elétrico. São possíveis separações de alta eficiência para moléculas de baixa a alta massa molecular, sejam elas neutras, iônicas ou ionizáveis. Na configuração mais atual, a CE foi apresentada por Jorgenson e Lukacs (1981) utilizando capilares de poucos micrometros de diâmetro, com aplicação de elevadas tensões para separar aminoácidos derivatizados. A concepção da eletroforese se deu pelo químico Arne Tiselius em 1937, que foi laureado com um Nobel de química em 1948, por contribuições em separações simbólicas para a notoriedade da técnica, ao estudar proteínas do soro sanguíneo (Landers, 2007). Nesta formatação o instrumento possuía mais de 6 metros de largura e 1,5 metros de altura, composto por um tubo em formato de U, onde as soluções dos tampões e amostra eram dispostas de modo que houvesse contato das extremidades com eletrodos de diferentes polaridades para a aplicação da tensão (Kay, 1988).

Este sistema foi miniaturizado para suportes como o gel de agarose e poliacrilamida, mas o seu transporte para capilares impactou em uso de tensões maiores, com o ganho em eficiência na transferência de calor, frequência analítica e reprodutibilidade (Jorgenson e Lukacs, 1983). Um esquema contendo as partes essenciais a um instrumento de CE moderno está representado na Figura 6.

Figura 6 – Diagrama representativo dos componentes básicos de um instrumento de eletroforese capilar com detecção na região do espectro ultravioleta.



Fonte: de autoria própria.

Em uma análise por CE, o capilar é acomodado para que suas extremidades fiquem em constante contato com os eletrodos, em igual altura de submersão nos reservatórios de solução, a fim de evitar a sifonação. O capilar é preenchido com o eletrólito de corrida (BGE) ao aplicar alguns segundos de pressão sob a solução do reservatório que o contém. Em seguida, insere-se a amostra por injeções hidrodinâmicas ou eletrocinéticas, respectivamente, aplicando pressões ou voltagens positivas para introduzir pela extremidade de entrada (inlet), enquanto as negativas o fazem pela saída (outlet). Por fim, a polaridade de cada eletrodo é definida e, em seguida, a diferença de potencial é aplicada, direcionando os compostos de acordo com sua difusão, mobilidade, retenção ou inércia até a janela de detecção (Shintani e Polonsky, 1997).

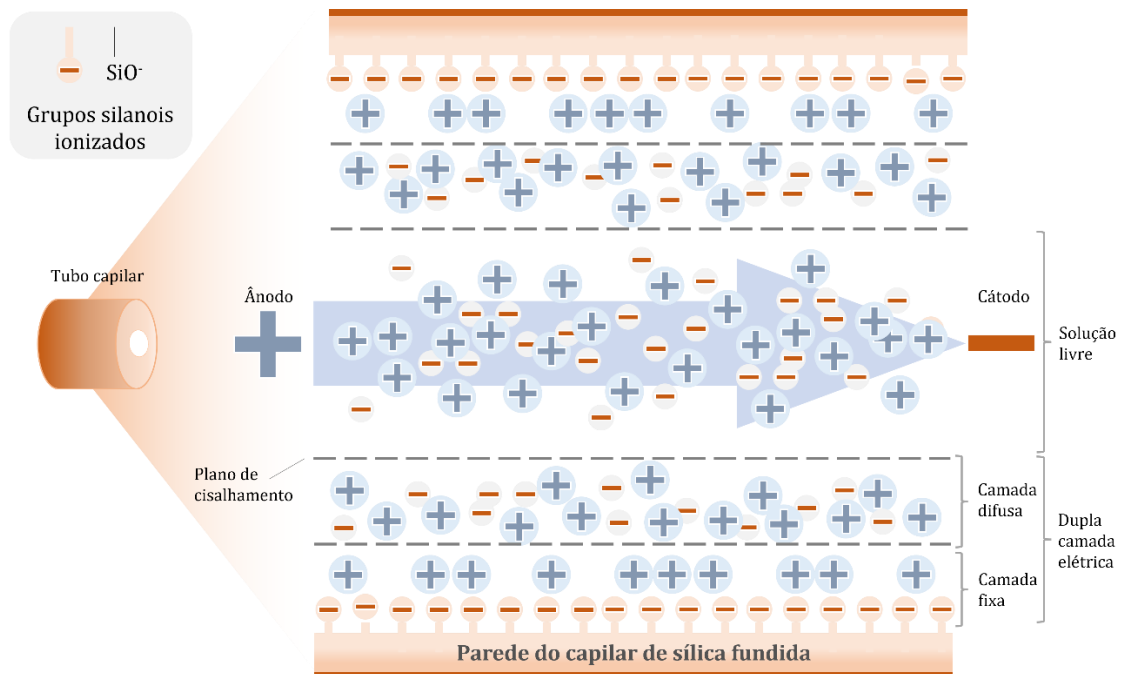
O tubo capilar é um dos componentes essenciais a separação e pode ter suas dimensões e natureza química alteradas em diferentes aplicações. Geralmente, o capilar é feito de sílica fundida, em formato cilíndrico oco e com especificações bem definidas. Por exemplo, o comprimento total (L_t) e efetivo (L_d), que é a distância até a janela de detecção, pode variar de dezenas de centímetros a poucos metros. Os diâmetros internos (d.i.) são mais recorrentes os de 50 e 75 μm . Este pode ser revestido externamente com a poliimida, para conferir resistência térmica e mecânica. Embora as especificações convencionais cubram uma ampla gama de aplicações, outros materiais podem ser utilizados (Landers, 2007; Shintani e Polonsky, 1997).

O capilar resiste à passagem de corrente e, essa energia elétrica é convertida a calor, sob aplicação de uma diferença de potencial proveniente da fonte de alta tensão. Esse fenômeno é conhecido como Efeito Joule e é responsável pelo aumento da temperatura do capilar, afetando a reprodutibilidade das separações (Knox e McCormack, 1994). Os sistemas modernos controlam e minimizam esse aspecto ao acondicionar o capilar em cartuchos termostatizados, seja por movimento de ventoinhas, imersão do capilar em líquidos de resfriamento ou banho por refluxo externo.

Ainda, o fato de os capilares de sílica fundida estarem preenchidos por soluções e serem expostos a ação de um campo elétrico ocasiona a indução da movimentação do solvente por um fenômeno conhecido como fluxo eletrosmótico (EOF) (Vitali, Fávere e Micke, 2011). Este tem como característica a geração do movimento da solução na direção do cátodo, como a representação de uma seção do capilar na Figura 7.

O eletrólito que preenche o capilar de sílica fundida pode proporcionar a desprotonação de grupos silanóis (SiOH), deixando-os ionizados (SiO⁻). O grau de ionização dos silanóis (pKa 3,6) pode variar com eletrólito, sua composição e pH. Nas paredes deste capilar, a alta densidade de cargas negativas atrai íons de carga oposta e que formam uma camada fixa fortemente ligada a esta superfície. Íons com maior liberdade móvel formam a camada difusa, pois estão sob ação de interação coulombica de menor intensidade, mas mantem-se próximos a camada fixa. Um equilíbrio entre as forças de atração com a camada fixa e a repulsão entre os íons que a compõe são características da camada difusa. Esta dupla camada elétrica que está adjacente a solução livre. Com a aplicação do campo elétrico gera-se uma diferença de potencial na dupla camada, promovendo uma movimentação nos íons da camada difusa, que dirigem a solução livre na direção do eletrodo de carga negativa (Landers, 2007).

Figura 7 – Representação da seção de um capilar de sílica fundida utilizado para separação em eletroforese capilar. A grande seta representa o sentido de migração do fluxo eletrosmótico que move os íons solvatados em direção ao cátodo.



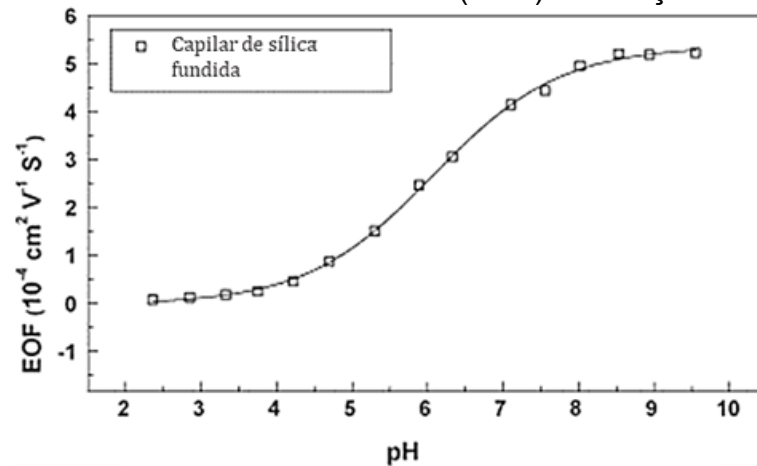
Fonte: de autoria própria.

O grau de desprotonação dos silanóis são proporcionais a magnitude do fluxo eletrosmótico. É possível mensurar a magnitude desta propriedade em termos de sua mobilidade (μ_{EOF}) que pode ser calculada pela Equação 1, mediante dados

experimentais de eletroferogramas em um dado pH. Com posse do L_d e L_t experimentais, da tensão aplicada (U) e do tempo de migração do EOF (t_{EOF}). O gráfico que relaciona a mobilidade do EOF com o pH está exposto na Figura 8.

$$\mu_{EOF} = \frac{L_d L_t}{t_{EOF} U} \quad (1)$$

Figura 8 – Mobilidade do fluxo eletroosmótico (EOF) em função do pH do eletrólito.



Fonte: adaptado de Vitali; Fávère; Micke (2011).

A exploração desta particularidade que é inerente aos capilares de sílica propiciou o desenvolvimento de estratégias que se adaptam a esta característica ou propõe-se a contorná-la. Desta maneira, destacaram-se modalidades que se subdividem em eletroforéticas, eletrocínéticas, eletrocromatográficas, focalização isoelétrica, dentre outras. A modalidade mais disseminada é a eletroforese capilar de zona (CZE) em que os solutos migram em uma solução com capacidade tamponante, dependendo de sua própria mobilidade, que pode sofrer alterações mediante aditivos como surfactantes e solventes orgânicos (Shintani e Polonsky, 1997).

O fato de a CZE ocorrer em uma fase homogênea possibilitou que a migração dos íons fosse descrita por modelos matemáticos. Para a determinação da mobilidade eletroforética (μ_e) a Equação 2 demonstra a dependência direta que esta tem com a carga (q) e inversa do produto do raio hidratado e da viscosidade (η) do BGE.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

A uma dada condição de pH, o equilíbrio de espécies pode estar deslocado a um determinado percentual de espécies na forma ionizada ou neutra. Matematicamente, isto pode ser representado pelo grau de dissociação (α). Nesta condição é evidenciada a mobilidade efetiva (μ_{ef}), calculada pelo produto descrito pela Equação 3.

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_e \quad (3)$$

A μ_{ef} é uma propriedade constante em um determinado BGE, desta maneira, as equações preveem e facilitam o desenvolvimento de métodos por estratégias de simulações *in silico*. Sendo desconhecida a μ_e para um determinado íon, esta propriedade pode ser obtida experimentalmente. Williams e Vigh (1996) reportaram um método rápido para determinação da mobilidade para cátions e ânions em uma única análise. Quando avaliada esta propriedade em uma ampla faixa de pH pode-se construir curvas de μ_{ef} versus pH e determinar a condição em que 50% das espécies estão dissociadas, onde há equivalência com o logaritmo da constante de dissociação ácida (pK_a). Um modelo experimental que se adeque e explique os dados experimentais, pode ser utilizado para o cálculo e determinação do pK_a (Fuguet *et al.*, 2008).

Com as informações de pK_a e da μ_e , softwares como o Peakmaster, desenvolvidos pela comunidade científica, aliam a alteração de parâmetros instrumentais, comuns a eletroforese capilar, e a observação de eletroferogramas com alta correlação com os obtidos experimentalmente (Oliveira Neves, de e Leal de Oliveira, 2020). A biblioteca de compostos agrega dados de pK_a e mobilidades iônicas que advém de trabalhos prévios da literatura (Hirokawa *et al.*, 1983, 1993). A ferramenta destaca-se por minimizar o dispêndio de insumos, número de experimentos e o tempo para otimização da separação. Dentre as variáveis independentes pode-se alterar o L_t , L_d , voltagem, polaridade dos eletrodos, a concentração e os componentes do BGE (Gas *et al.*, 2005). A uma dada composição de BGE, o software retorna o seu pH, força iônica, condutividade, resistividade e a capacidade tamponante. Ainda, o software corrige a mobilidade e a calcula utilizando os coeficientes de atividade, respectivamente, pelas equações de Onsager-Fuoss e Debye-Hückel (Gaš, 2023).

2.3.1 Eletroforese capilar na determinação de 4-trans-hidroxi-L-prolina para acessar o teor de colágeno

Uma fatia dos estudos acadêmicos encontrados na base de periódicos *Web of Science*, publicados de 1990 até 2023, contendo as palavras chaves “capillary electrophoresis” and “*hydroxyproline*”, retornou 76 artigos. Em média, foram 2,30 publicações por ano, sendo 2 artigos de revisão, 40 associados as ciências de separação e outros de diversas áreas do conhecimento. A inclusão do termo “*meat*” limitou os resultados a 4 estudos e a associação de “*dietary supplements*” encontrou 1. A Tabela 1 sumariza particularidades dos métodos de CE. Para comparação, foram incluídos trabalhos citados na seção 2.2.3 que utilizaram a cromatografia a líquido.

Os métodos reportados por CE foram mais rápidos e atingiram limites de detecção equiparáveis aos de HPLC. A cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) com dodecilsulfato de sódio foi a principal modalidade de separação explorada na determinação de HYP (Chu, Evans e Zeece, 1997; Dong *et al.*, 2012; Mazorra-Manzano *et al.*, 2012). Dong *et al.* (2012) monitoraram o derivado de HYP com fluoro-4-nitro-benzofurano (NBD-F) ao realizar a reação de derivatização *online*, dentro do capilar, e detectá-lo por fluorescência induzida por laser (LIF). Mazorra-Manzano *et al.* (2012) desenvolveram um método para amostras de produtos cárneos mexicanos usando um derivado com fluorescamina e detecção por fluorescência, para construir um índice do teor de colágeno para produtos cárneos. Um CE modificado com detecção no capilar de fluorescência induzida em fibra ótica emissora de luz (ICOF-LED-IFD-CE) determinou o derivado de HYP com isotiocianato de fluoresceína em tempo de análise curto e em condições amenas. No entanto, esse método ainda exigiu derivatização em um sistema CE convencional (Ji *et al.*, 2018).

A única determinação em suplementos alimentares de 4-hidroxiprolina é a reportada por Bernardo-Bermejo *et al.* (2023), em um método de eletrocromatografia assistida por ciclodextrina (CD-EKC) utilizando a metil- β -ciclodextrina na separação dos derivados da reação entre o padrão de HYP e seus estereoisômeros com cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl). Dentre os estereoisômeros, apenas a HYP possuiu concentrações detectáveis nas amostras. Ainda, a análise de hidrolisados de colágeno perimisial e músculo bovino realizada por Chu *et al.* (1997) revelou apenas a forma trans da HYP sem a interferência de seus isômeros planos e espaciais, ao monitorá-lo após derivatização com feniltiohidantoína.

Tabela 1 – Métodos de separação em meio líquido na determinação de colágeno via 4-hidroxi-L-prolina em matrizes alimentícias (continua)

Analitos	Amostras	Método analítico				
		Preparo de amostra ou Procedimento extrator	Instrumentação e condições do método de análise	Exatidão (CV%)	LOD/LOQ ¹ (µg L ⁻¹)	Refs.
trans-4-hidroxi-L-prolina (perfil de aminoácidos)	59 amostras de gelatinas de origem animal e vegetal	1) Hidrólise (24 h - 110°C), 200 mg em 5 mL HCl 6 mol L ⁻¹ 2) Avolumar em balão de 100 mL 3) Filtração em seringa (0,45 mm) 4) Derivatização com AccQ-Fluor TM	HPAEC-FLD ² (50 min.) AccQ Tag - 36°C (150 x 3,9 mm, 4 µm) injeção 10 µL, gradiente – 1,0 mL min ⁻¹ (A) AccQ Tag TM Eluent (1:10) (B) ACN (100%) (C) H ₂ O	85-100	2,02/ 6,72	Yuswan et al. (2021)
trans-4-L-hidroxiprolina (perfil de aminoácidos)	mortadella di bologna, salamini italiani alla cacciatora e massas frescas recheadas	1) Hidrólise em micro-ondas (20 min.), 25 mg em 8 mL de HCl 6 mol L ⁻¹ ; 2) Evaporação; 3) Reconstituição com 0,1 N HCl 4) Filtração	HPAEC-PAD ³ (62 min.) Aminopac PA10- 25°C (250 x 2,0 mm, 8,5 µm) injeção 25 µL, gradiente – 0,25 mL min ⁻¹ (A) NaOH 250 mmol L ⁻¹ (B) H ₃ CCOONa 1 mol L ⁻¹	97-104	[n.i.]	MESSIA et al., (2008)
trans-4-hidroxi-L-prolina	10 amostras de músculos semimembranosus de ovelha	1) Desengorduração 2) Hidrólise (10 h em N ₂ - 110°C), 3 mg em 2 mL HCl 6 mol L ⁻¹ 3) Liofilização 4) Reconstituição em 1 mL HCOOH 0,1%	LC-MS/MS ⁴ (5 min.) - 132 > 68 m/z Zorbax SB-Aq - [n.i.] injeção 10 µL, isocrático – 0,7 mL min ⁻¹ (A) HCOOH 0,1% (B) ACN, HCOOH 0,1%	90-108	0,69/ [n.i.]	Colgrave et al. (2008)
trans-4-hidroxi-L-prolina e prolina	14 amostras de produtos cárneos diversos	1) Hidrólise (6 h - 150°C), 3,0 mg em HCl 6 mol L ⁻¹ ; 2) Evaporação sob vácuo; 3) Reconstituição 0,2 N citrato (pH 2,2) 4) Derivatização com NBD-Cl ⁵ (5 min.)	HPLC-FLD (15 min) - 430 (ex.) - 624 (em.) nm Microsorb short-one C18 (100 x 4,6 mm, 3 µm) injeção - 10 µL, gradiente – 1,0 mL min ⁻¹ (A) H ₃ CCOONa 0,1 M (pH 7.2) (B) Metanol:tetrahidrofurano (80:20)	94-100	0.003/ [n.i.]	VÁZQUE Z-ORTÍZ et al. (2004)

Tabela 1 – Métodos de separação em meio líquido na determinação de colágeno via 4-hidroxi-L-prolina em matrizes alimentícias (continuação)

Analitos	Amostras	Método analítico				
		Preparo de amostra ou Procedimento extrator	Instrumentação e condições do método de análise	Exatidão (CV%)	LOD/LOQ (mg L ⁻¹)	Refs.
hidroxiprolina	Chorizo mexicano, salsicha, linguiçae presunto cozido	1) Hidrólise (16h - 105°C) 4 g em 30 mL 7 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ ; 2) Neutralização 4 mol L ⁻¹ NaOH, TBS 0,1 mol L ⁻¹ 3) Filtração (0,22 mm) 4) Derivatização com fluorescamina 5) Evaporação por centrifugação (75°C)	MEKC-DAD ⁶ (20.0 min.) - 214 nm ⁷ BGE: 50 mmol L ⁻¹ tetraborato (pH 9,3), 100 mmol L ⁻¹ dodecilsulfato ⁸ L _t : 57 cm ⁹ L _d : 50 cm; 50 µm ¹⁰ d.i. 30 mbar por 10 s, 12 kV, 33°C	[n.i]	[n.i]	Mazorra-Manzana et al. (2012)
trans-4-hidroxi-L-prolina e estereoisómeros	20 amostras de Tenseur forte (suplementação de hidroxiprolina)	1) Dissolução das amostras em tampão borato 200 mmol L ⁻¹ (pH 9,0) 2) Banho ultrassónico por 15 min. 3) Centrifugação por 10 min. 4) Derivatização com ¹¹ FMOC-Cl (2 min.)	¹² CD-EKC-DAD (21 min.) - 200 nm BGE: 10 mmol L ⁻¹ metil-γ-CD, 75 mmol L ⁻¹ fostato (pH 7,0) L _t : 80,5 cm L _d : 72 cm; 50 µm d.i. 50 mbar por 10 s, 15°C, 30 kV	94-116	0,15/ 0,47	Bernardo-Bermejo et al. (2023)
L-hidroxiprolina	Bebidas lácteas e leite em pó	1) Hidrólise (16h em N ₂ - 105°C) 100 mg em 15 mL 6 mol L ⁻¹ HCl 2) Filtração 3) Centrifugação 4) Rota-evaporação (eliminar HCl) 5) Neutralização com NaOH 6) Derivatização com fluoresceína	¹³ ICOF-LED-IFD-CE (8 min.) BGE: 20 mmol L ⁻¹ borato (pH 9,4) L _t : 47,5 cm L _d : 45 cm; 75 µm d.i. 20 cm por 15 s 17 kV	98-103	0,08	Ji et al. (2018)

Tabela 1 – Métodos de separação em meio líquido na determinação de colágeno via 4-hidroxi-L-prolina em matrizes alimentícias (conclusão)

Analitos	Amostras	Método analítico				
		Preparo de amostra ou Procedimento extrator	Instrumentação e condições do método de análise	Exatidão (CV%)	LOD/LOQ (mg L ⁻¹)	Refs
trans-4-hidroxi-L-prolina e estereoisómeros	Colágeno perimisial e músculo bovino	1) Hidrólise (24h em N ₂ - 110°C) 50 mg em 5 mL 6 mol L ⁻¹ HCl 2) Evaporação por centrifugação 3) Derivatização com o-ftaldeído 4) Derivatização com feniltiodantoína	MEKC-DAD (15 min.) - 254 nm BGE: 75 mmol L ⁻¹ dodecilsulfato, 50 mmol L ⁻¹ malonato (pH 5,0) L _t : 40 cm L _d : 40 cm; 50 µm d.i. revestido com dietanolamina, 15 kV	89-99	[n.i.]	Chu et al. (1997)
L-prolina e L-hidroxiprolina	Bebidas lácteas/soja e leite em pó	1) Hidrólise de acordo com GB/T 5009.124-2003 - China 2) Diluição de 10000 vezes 3) Derivatização <i>in-capillary</i> ¹⁴ NBD-F	¹⁵ MEKC-LIF (7 min.) - 473 (ex.) - 520 (em.) nm BGE: 30 mmol L ⁻¹ dodecilsulfato, 25 mmol L ⁻¹ tetraborato (pH 9,7) L _t : 50,2 cm L _d : 40 cm; 50 µm d.i. 35 mbar por 5 s, 25°C, 20 kV	95-103	0,002/[n.i.]	Dong et al. (2012)

Legenda e siglas: ¹LOD e LOQ – limites de detecção e quantificação; ²HPAEC-FLD – cromatografia líquida de troca iônica com detecção por fluorescência; ³HPAEC-PAD - cromatografia líquida de troca iônica com detecção amperométrica; ⁴LC-MS/MS – cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial; ⁵NBD-Cl - 7-cloro-4-nitro-benzofurano; ⁶MEKC-DAD – eletrocromatografia micelar com detecção de arranjo de diodos; ⁷BGE: eletrólito de corrida; ⁸L_t: comprimento total do capilar; ⁹L_d: comprimento do capilar até a janela de detecção; ¹⁰d.i.: diâmetro interno; ¹¹FMOC-Cl: Cloroformiato de 9-fluorenilmetila; ¹²CD-EKC-DAD: eletrocromatografia assistida por ciclodextrina e detecção de arranjo de diodos; ¹³ICOF-LED-IFD-CE: eletroforese capilar com detecção no capilar por fluorescência induzida em fibra ótica emissora de luz; ¹⁴MEKC-LIF: eletrocromatografia micelar com detecção de fluorescência induzida por luz.

A baixa detectabilidade da HYP por CE convencional foi registrada por (Guzman *et al.*, 1992) que exibiu eletroferogramas isentos de sinais, entretanto obteve sucesso na detecção dos derivados de fluoroescamina em 214 nm. Para analitos com baixa absorvidade molar, a CE apresenta uma alternativa promissora e indireta de detecção UV. Com a vantagem de não requisitar modificações nos instrumentos convencionais ou aquisição de consumíveis de difícil disponibilidade.

2.3.2 Detecção ultravioleta indireta por eletroforese capilar

O método proposto por (Oliveira Neves, de e Leal de Oliveira, 2020) determinou, simultaneamente, a creatinina e o perfil de aminoácidos em 200 nm. Neste trabalho, foi observado um limite de quantificação (LOQ) de 8,24 mg dL⁻¹ (injeção de 15 mbar por 4 s) para a creatinina, que possui maior absorvidade molar comparado aos aminoácidos, cuja estrutura não contém ampla conjugação de elétrons π , como é o caso da HYP. Este valor exemplificou a limitação da quantificação direta dos aminoácidos quando não derivatizados.

A reação de derivatização é uma etapa adicional em um desenvolvimento de métodos e, como conseqüente, uma fonte de erros. Ainda, a indisponibilidade ou custo de aquisição do reagente derivatizante pode vir a inviabilizar o experimento. Uma alternativa para contornar a obrigatoriedade desta etapa, que também visa determinar espécies com baixa absorvidade molar, é a detecção UV indireta viabilizada pela instrumentação e composição de BGEs utilizada pela CZE.

Nesta estratégia é incorporado ao BGE um componente que possua a característica de absorver radiação eletromagnética na região do UV, promovendo constante absorbância de fundo. Desta maneira, o analito é detectado como um pico decrescente no eletroferograma ao substituir o componente cromóforo do BGE quando ambos estão passando pela janela de detecção (Landers, 2007). Tal fato propicia o monitoramento do analito pelo decréscimo na absorbância do BGE. A sensibilidade da detecção é dependente da absorvidade molar do componente cromóforo em seu comprimento de onda de máxima absorção, sua concentração ser alta suficiente para viabilizar uma faixa dinâmica abaixo da saturação do detector, da carga deste componente e, bem como, a razão de transferência que consiste no número de mols do cromóforo que é substituído por 1 mol do analito. A substituição equimolar tem ocorrência quanto mais próxima for a mobilidade eletroforética do

cromóforo e do analito. Tal fato corrobora para a detectabilidade pelos mesmos princípios da EMD, minimizando distorções de um pico gaussiano e potencializando a eficiência eletroforetica (BUCHBERGER; COUSINS; HADDAD, 1994).

Na modalidade de detecção UV indireta, de maneira geral, os aminoácidos são suscetíveis a retornarem sinais negativos, devido a absortividade molar destes analitos ser inferior à maioria dos cromóforos utilizados na composição do BGE. Desta maneira, em hidrolisados proteicos são previsíveis eletroferogramas característicos de perfis de aminoácidos totais, cuja riqueza de sinais pode ocasionar problemas de seletividade que inviabilizam a análise ou causam problemas de precisão e exatidão em análises quantitativas.

Neste sentido, os parâmetros instrumentais de CE podem ser otimizados por estratégias *in silico* e planejamentos de experimentos (DOE) (Hancu *et al.*, 2021; Orlandini, Gotti e Furlanetto, 2014). Ainda, uma classe de compostos que se destaca na separação de estereoisomêros, pode ser utilizada como aditivo no BGE para ajustar problemas de comigração e seletividade, estas são as ciclodextrinas (CD).

2.3.3 β -ciclodextrina na eletroforese capilar

As ciclodextrinas nativas e funcionalizadas são uma classe de aditivos aplicados à CE e às ciências da separação, pelo seu reconhecimento enantiomérico e, por conseguinte, separação quiral. São oligossacarídeos compostos por unidades de d-glucopiranosose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 4). Obtidos a partir da degradação do amido quando obtidos os produtos de 6, 7 e 8 unidades de glicose, identificadas, respectivamente como α , β e γ -ciclodextrinas. Aumentam a seletividade de separação devido à sua conformação espacial criar uma cavidade central hidrofóbica e exterior hidrofílico devido aos grupos hidroxila (Zhou, Tang e Ng, 2013).

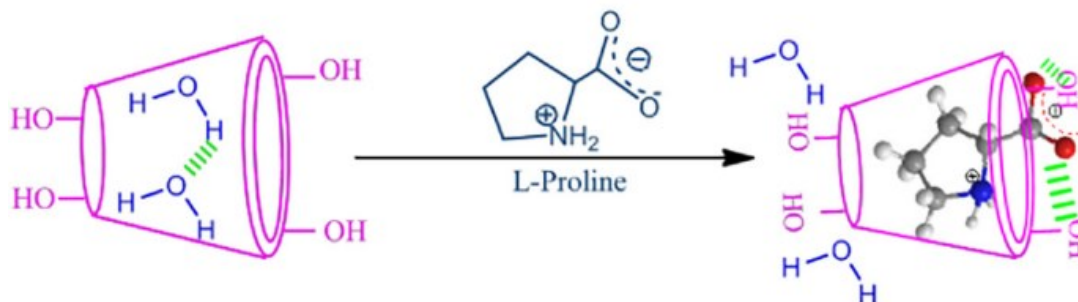
Dentre as ciclodextrinas nativas, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais eficiente em separações por CE em termos de seletividade para analitos de baixa massa molar (Luong e Nguyen, 1997; Szenté e Szemán, 2013). As hidroxilas da β -CD conferem solubilidade em água, porém limitada a 16,3 mmol L⁻¹ a 25°C (Cedillo-Flores *et al.*, 2022). Possui alta estabilidade em pH alcalino e ainda se apresenta neutra em ampla faixa de pH, com pK_a de 13,5 \pm 0,2 a 22,5°C, respectivo as hidroxilas adjacentes aos

carbonos 2 e 3 (Gaidamauskas *et al.*, 2009). Sua atoxidade, baixo custo comparado as outras CDs e biocompatibilidade, a tornam interessante para inúmeras aplicações.

Em artigo de revisão, Kitagawa e Otsuka (2011) definem diferentes mecanismos de separação associados ao uso das CDs em CE. Em suas formas neutras ocorre o mecanismo de CZE e a seletividade, bem como a diferença na difusão original, podem ser ampliadas pela formação de um complexo de inclusão, quando houver afinidade e interação entre os analitos com as CDs e pelo encontro entre ambas as zonas. Ainda, as CDs podem formar uma pseudo-fase estacionária por interação com os grupos silanóis quando inclusas carregadas na composição do BGE, mais comumente, como derivados aniônicos e catiônicos. Ocorre a interação dos analitos com esta nova fase, caracterizando o mecanismo de cromatografia eletrocínética assistida por ciclodextrina (CD-EKC). Este termo hifenado foi cunhado para diferenciar o agente que propicia a assistência e manutenção do mecanismo de separação, como por exemplo, as micelas em MEKC. Porém, a comunidade científica ora reporta métodos CD-CZE como CD-EKC e vice-versa. Por exemplo as características químicas dos derivados metilados e sulfonados da β -CD foram exploradas como pseudo-fases estacionárias em um método CD-EKC, e uma de suas aplicações foi a enantioseparação de aminoácidos (Bernardo-Bermejo *et al.*, 2023; Pérez-Míguez, Marina e Castro-Puyana, 2016; Zhou, Tang e Ng, 2013).

A evidência de formação de complexos de inclusão em uma proporção 1:1 entre a β -CD com aminoácidos como a L-prolina, L-metionina e L-glutamina foram reportados nos ensaios de Kundu, Saha e Roy (2017), após avaliação da variação das tensões superficiais de soluções aquosas contendo quantidades crescentes de β -CD e confirmada também por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H NMR}$). Outro estudo que reforça esta hipótese é o de Zaboub *et al.* (2016), e em ambos os trabalhos evidências de que as interações hidrofóbicas ocorreram entre a cavidade de β -CD e os aminoácidos, porém predominantemente e em maior intensidade as interações hidrofílicas entre os zwitterions e as hidroxilas. Embora, não haja estudos avaliando a inclusão da HYP com a β -CD esta estratégia parece promissora, especificamente pela evidência experimental e por cálculo computacional de formação do complexo com um aminoácido análogo, a PRO, como representado na Figura 9.

Figura 9 – Representação da formação do complexo de inclusão entre L-prolina e b-ciclodextrina.



Fonte: Retirado de Kundu & Saha & Roy (2017).

2.4 AVALIAÇÃO DO VERDOR DE MÉTODOS ANALÍTICOS

No geral, a eletroforese capilar pode ser considerada uma escolha verde dentre os métodos de separação disponíveis. Especialmente, pelo baixo consumo de reagentes e mínima produção de resíduos (Ranasinghe e Quirino, 2021). Porém, os métodos precisam ser avaliados sobre diretrizes para que esta consideração faça sentido. Gałuszka, Migaszewski e Namieśnik (2013) citam 12 princípios da química analítica verde que incluem: Técnicas analíticas diretas para evitar preparo de amostra (1); Minimizar a quantidade e o número de amostras (2); Medidas *in situ* (3); Integração de processos e operações analíticas para poupar energia (4); Métodos automatizados e miniaturizados (5); Evitar derivatizações (6); Evitar geração de grandes volumes de rejeito e providenciar a gestão do resíduo analítico (7); Optar por métodos multianalitos ou multiparâmetros (8); Uso energético minimizado (9); Preferível reagentes de fontes renováveis (10); Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos (11); A segurança do operador deve ser ampliada (12).

Atualmente, são diversas as alternativas para realizar a avaliação do verdor dos métodos analíticos. A eco-escala analítica utiliza de pontos de penalidade para avaliação de características do método, em termos do risco e perigo que as substâncias oferecem, o risco ocupacional, o consumo de energia e a geração de resíduos. Por fim, são atribuídos e deduzidos os pontos de penalidade do método que inicia com 100 pontos, ou seja, a suposição de que o procedimento é 100% verde. As faixas de avaliação, após a dedução dos pontos de penalidade são: maior que 75 e 50 são considerados procedimentos excelentes e aceitáveis, enquanto os abaixo de 50 são classificados como inaceitáveis (Gałuszka *et al.*, 2012).

Ainda, Nowak, Wietecha-Posłuszny e Pawliszyn (2021) ampliaram a avaliação por um algoritmo desenvolvido em uma planilha do software Excel, atribuindo o conceito de química analítica branca, ao adicionar critérios e aspectos analíticos e práticos, atribuindo para estes parâmetros, respectivamente, as cores vermelha e azul, que quando combinadas ao verde resultam na cor branca e suas nuances.

Todavia, as alternativas mais diretas e práticas são métricas que podem ser mensuradas por softwares, tornando a medida mais conveniente e menos suscetível a erros. Algumas ferramentas destacaram-se para medições voltadas para o preparo de amostra, bem como para reportar a todo o método analítico (Pena-Pereira *et al.*, 2022; Pena-Pereira, Wojnowski e Tobiszewski, 2020; Płotka-Wasyłka, 2018). Em especial, a ferramenta AGREE tornou-se interessante por viabilizar a atribuição de valores de 0 a 1 para os métodos, sendo 1 a suposição de máximo verde analítico. Este valor fica no centro de uma circunferência subdividida em 12 seções enumeradas, cuja nuance de cor verde, amarelo e vermelho indica da maior para a menor concordância com os 12 princípios da química analítica verde (Pena-Pereira, Wojnowski e Tobiszewski, 2020).

Diante de todo o contexto apresentado, desde as matrizes, as estratégias de separação mencionadas e as ferramentas de avaliação dos princípios de química analítica verde, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um novo método por eletroforese capilar com detecção UV indireta para determinar o teor de colágeno via quantificação da HYP em produtos cárneos e suplementos alimentares. Alternativamente, avaliar a viabilidade de realizar a mesma aferição por outra via, ao desenvolver um método também por eletroforese capilar para determinar o ácido 2-pirrolcarboxílico como produto da oxidação da trans-4-hidroxi-L-prolina com cloramina-T. Em ambas as abordagens pretendem-se evitar o uso de derivatizantes, minimizar o uso da massa de amostras e volume de solventes e utilizar a passivação para tornar inócuo o resíduo gerado para que o método desenvolvido esteja alinhado aos preceitos da química analítica verde.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a eletroforese capilar para desenvolver novos métodos independentes, em que ambos visem determinar o teor de colágeno pela via de quantificação da 4-trans-L-hidroxiprolina e do ácido 2-pirrolcarboxílico em amostras de suplementos alimentares e produtos cárneos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinação do ácido 2-pirrolcarboxílico

- Realizar curva de mobilidade versus o pH, a fim de determinar o pKa e a faixa de pH mais promissora para desenvolver o método para o ácido 2-pirrolcarboxílico;
- Utilizar a experimentação *in silico* para selecionar os componentes do BGE e suas concentrações, o padrão interno e os valores para os parâmetros de separação;
- Comparar a separação simulada com a experimental e avaliar a sua repetitividade nas condições otimizadas;
- Avaliar a linearidade e a seletividade;
- Realizar hidrólise, neutralização e oxidação de solução simuladas e amostra de produto cárneo;
- Identificar produtos e interferentes da reação por MECK e MS;

3.2.2 Determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina

- Utilizar a experimentação *in silico* para seleção do pH, composição do BGE e padrão interno;
- Comparar eletroferogramas simulados e experimentais nas condições observadas para otimização *in silico*;

- Utilizar estratégia multivariada para a escolher o comprimento do capilar, tensão, temperatura e concentração de b-ciclodextrina para ampliar a seletividade da separação entre aminoácidos interferentes e a HYP em padrões aquosos;
- Hidrolisar amostras de suplementos alimentares e produtos cárneos;
- Avaliar a limpeza da amostra pela concomitante precipitação e neutralização dos hidrolisados com carbonato de estrôncio;
- Validar o método desenvolvido em termos de linearidade, seletividade, efeito de matriz, precisão e exatidão;
- Analisar por estatística comparativa o teor de colágeno e HYP observados pelo método proposto e por um método de LC-MS/MS;
- Aplicar o método em amostra reais e determinar o teor de colágeno em amostras disponíveis no comércio nacional;
- Avaliar o veredor analítico do método desenvolvido, tanto pela eco escala quanto pelo software AGREE.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram preparadas soluções com reagentes de grau analítico em água ultrapura a 18,2 MΩ cm (Millipore, Bedford, EUA). O método desenvolvido para o P2C ($\geq 99,0\%$) requisitou de cloramina-T (99,0%) ácido clorogênico (95,0%), tris-hidroximetilaminometano (TRIS, 99,9%), ácido morfolinoetanosulfônico (MES, 99,0%), ácido acético (99,7%), ácido isobutírico (99,0%) e ácido hidroxibutírico (98,0%) obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido fosfórico (85,0%), dihidrogênio-fosfato (99,0%), monohidrogênio-fosfato (98,0%), bicarbonato (99,0%) e carbonato de sódio (99%) foram obtidos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) e o ácido láctico (85,0%) da Synth (São Paulo, Brasil).

Para determinar a HYP ($\geq 99,0\%$) foram utilizados o ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico (CHES, $\geq 99,0\%$), ácido 4-morfolinopropanossulfônico (MOPS, $\geq 99,5\%$), histidina (HIS $\geq 99,0\%$), triptofano (98,0%), β -CD, ($\geq 97,0\%$), butilamina (BUT, $\geq 99,5\%$), alanina (98,0%), serina (99,0%), valina (98,0%), metionina (98,0%), cisteína (98,0%), tirosina (98,0%), fenilalanina (98,0%), PRO (99,0%), GLY (99,0%), ácido aspártico (98,0%), asparagina (98,0%), arginina (98,0%), ácido glutâmico (99,0%), glutamina (99,0%), treonina (98,0%), lisina (98,0%), isoleucina (98,0%), leucina (98,0%) e taurina (99,0%) adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido sulfúrico (95-98%) da Vetec (São Paulo, Brasil) e o carbonato de estrôncio (98,0%) da Labsynth (São Paulo, Brasil) utilizados para hidrolisar e limpar a amostra, respectivamente. O hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) foi adquirido da Agilent Technologies (Palo Alto, EUA). Diariamente, foram preparadas a 1000 mg L^{-1} soluções-estoque de HYP, CHES (padrão interno (IS) de amostras de suplementos alimentares) e MOPS (IS para produtos cárneos).

4.2 INSTRUMENTAL

4.2.1 Instrumento de eletroforese capilar

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de CE equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo 7100, Agilent Technologies, Palo Alto,

EUA). O software Chemstation (versão A.06.01, Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) foi utilizado para a análise dos dados.

4.2.2 Condições instrumentais para o do método de determinação do ácido pirrol-2-carboxílico por CZE-DAD

Para a determinação direta do P2C, o capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliamida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 32 cm x 50 μm d.i. x 375 μm d.e. foi preenchido com um BGE composto por 20 mmol L^{-1} de ácido láctico e 40 mmol L^{-1} de TRIS, resultando em pH 8,1, a 25°C. A amostra foi introduzida na extremidade mais próxima da janela de detecção, com 8,5 cm de L_d , por aplicação de uma pressão de -50 mbar por 5 segundos. A polaridade do eletrodo foi definida como negativa a -30 kV de tensão. A detecção foi de 255 nm e a padronização interna realizada com ácido clorogênico. Novos capilares foram condicionados sob pressão de 950 mbar em lavagens de hidróxido de sódio 1,0 mol L^{-1} , água deionizada e BGE por 30 minutos cada. Entre análises, 30 segundos de BGE foram admitidos como tempo de pré-condicionamento.

4.2.3 Condições instrumentais para execução do método de determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina por CD-CZE-DAD com detecção UV indireta

A determinação da HYP foi realizada em um capilar de sílica fundida L_t de 64,5 cm, sendo 56 cm de L_d 75,0 μm de d.i. x 375,0 μm d.e. (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA). Novos capilares foram condicionados com NaOH 1 mol L^{-1} (30 minutos), água (10 minutos) e BGE (10 minutos). Entre as corridas, a capilar foi condicionado com BGE por 75 segundos. Este foi substituído a cada 10 corridas. O BGE foi composto por HIS 25 mmol L^{-1} , BUT 180 mmol L^{-1} e β -CD 10 mmol L^{-1} , a um pH 11,4 ($\pm 0,1$). O pH foi medido com um pHmetro modelo B474 (Micronal, São Paulo, Brasil). O BGE foi submetido a banho ultrassônico por 4 minutos e filtrado em filtros de seringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 μm (Filtrilo, Paraná, Brasil). O pH das amostras foi ajustado para 11,4 usando BUT e foram injetadas em modo hidrodinâmico, a 50 mbar por 7 segundos e 15 segundos para suplementos alimentares e para produtos cárneos, respectivamente. As separações foram

realizadas a 12,5 °C. A detecção foi feita em 220 nm. A voltagem de separação foi ajustada para 30 kV com polaridade positiva na extremidade de injeção. A temperatura do laboratório foi mantida a 20°C e a umidade abaixo de 10%.

4.2.4 Instrumentação e condições do método comparativo para determinação da trans-4-hidroxi-L-prolina por LC-MS/MS

O método comparativo utilizando LC-MS/MS foi adaptado de Colgrave, Allingham e Jones (2008) para a quantificação de HYP e determinação do teor de colágeno em amostras selecionadas. Foi utilizado um sistema de HPLC (modelo série 1200, Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) acoplado a um MS equipado com um analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por electrospray (ESI) (modelo Q trap 3200/Turbo VTM, Applied Biosystems/MDS Sciex, Vaughan, Canadá). As separações foram realizadas em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm; 3,5 µm) adquirida da Agilent Technologies (Palo Alto, EUA). A vazão da fase móvel foi de 200 µL min⁻¹ e esta era composta por 95% de ácido fórmico 0,1% (A) e 5% acetonitrila:água (95:5, B). A temperatura da coluna foi ajustada para 30 °C. O volume de injeção foi de 5,0 µL. A voltagem de ionização foi selecionada no modo positivo a 5500 V, a temperatura em 450 °C, o fluxo de *curtain gas* a 20 psi, gás nebulizador 1 a 35 psi, gás nebulizador 2 a 20 psi e o fluxo médio para o gás da célula de colisão (CAD). Para a quantificação de HYP, a taurina (TAU) foi usada como IS, e as transições foram, respectivamente, m/z 132,0 → 68,0 e m/z 126,0 → 44,0, enquanto para confirmação, a transição de m/z 132,0 → 58,0 e m/z 126,0 → 108,0. A exatidão do método proposto foi avaliada comparando-se estatisticamente o teor de colágeno (g/100 g) em amostras de pó para bebida e linguiça *brühwurst*.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO E SUA APLICAÇÃO

4.3.1 Determinação do pKa e mobilidade do ácido pirrol-2-carboxílico

A curva de mobilidade do P2C em função do pH foi determinada utilizando o procedimento descrito por Williams e Vigh (1996). Os experimentos foram em sete

diferentes BGEs aquosos com força iônica aproximada de 20 mmol L⁻¹ e valores de pHs entre 2,0 e 8,5. O ácido benzoico, de mobilidade conhecida, foi selecionado como controle e submetido ao mesmo procedimento. As mobilidades calculadas foram corrigidas pela equação de Onsager-Fuoss. A descrição detalhada do procedimento utilizado, o equacionamento, a concentração, pH estimado e experimental, bem como a composição de cada tampão e os eletroferogramas podem ser visualizados no Apêndice A. Por fim, a determinação do pK_a para o P2C baseou-se na relação entre a mobilidade efetiva e o pH. O modelo matemático que melhor descreveu a função para o P2C está apresentado no Apêndice B e foi avaliado pelo OriginLab ver. 2023b.

4.3.2 Otimizações *in silico* das condições de análise do ácido pirrol-2-carboxílico

No software Peakmaster (ver. 5.4) foram fixados o L_d em 8,5 cm e L_t de 32 cm, polaridade positiva na extremidade da injeção e 30 kV de tensão. A composição do BGE foi selecionada com o suporte da base de dados do software. Suas concentrações foram otimizadas de modo univariado com incrementos de 2 mmol L⁻¹ para cada nível. A concentração do contra-íon foi avaliada de 18 a 40 mmol L⁻¹, com o co-íon fixado em 15 mmol L⁻¹. A condição selecionada foi então fixada para a avaliação da concentração do co-íon de 16 a 36 mmol L⁻¹. Os critérios de avaliação foram quanto aos parâmetros para o BGE como a força iônica, capacidade tamponante e o pH, além de variáveis para o analito como a mobilidade e EMD. A condição de compromisso foi admitida para o experimento que proporcionou, simultaneamente, valores de máxima força iônica de, aproximadamente, 20 mmol L⁻¹, maiores valores de capacidade tamponante e menores de EMD. Por fim, a condição otimizada foi comparada com uma análise real. O IS foi também selecionado com a base de dados do software. A repetitividade (n = 50) foi verificada em termos do coeficiente de variação (CV) para área normalizada e o tempo de migração do P2C. Ainda, o peakmaster auxiliou na seleção dos interferentes para avaliação da seletividade

4.3.3 Aplicação do método em amostras simulada e investigação dos produtos da reação

Para avaliar a conversão em P2C, uma amostra de padrão de HYP foi submetida aos procedimentos descritos pela AOAC 990.26, para a hidrólise ácida em ácido sulfúrico $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ e reação de oxidação com cloramina-T (Kolar, 1990). Após a amostra estar a temperatura ambiente, o hidrolisado foi neutralizado ou foi utilizada a cloramina-T em tampão. Foi considerado um excesso de cloramina-T de 10 vezes ou mais a quantidade molar de HYP, para o padrão sintético, em um tempo de reação de 20 minutos. Uma alíquota da reação foi transferida para vial e injetado no instrumento de CE. Esta mesma reação foi submetida a análise por MECK em dodecilsulfato de sódio (SDS) e tampão de tetraborato de sódio (pH 9,0) e infusão no MS para investigação dos produtos formados.

4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA

4.4.1 Estratégia in silico para seleção do pH, composição do BGE e padrão interno

O software PeakMaster foi utilizado para selecionar o pH, os componentes do BGE (co-íon e contra-íon) e o IS. Os 20 aminoácidos foram também incluídos no estudo como potenciais interferentes na separação da HYP. A análise foi avaliada de acordo com a dispersão por EMD, força iônica e capacidade tamponante retornadas pelo software com variações na concentração dos componentes do BGE. As dimensões da capilar, polaridade e voltagem foram as mesmas da seção 4.3.2. O valor da mobilidade do EOF usada nas simulações foi baseada no reportado pelo estudo de Vitali, Fávere e Micke (2011) para uma capilar de sílica fundida ($+53 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A seleção do IS foi baseada no banco de dados do PeakMaster, e a viabilidade de seu uso foi avaliada em amostras reais.

4.4.2 Otimização da separação por análises multivariadas

Para promover a completa separação de HYP dos AA interferentes, a β -CD foi empregada na composição do BGE e o efeito de sua concentração foi avaliada na separação de HYP. Incluindo este parâmetro, a temperatura de separação, o comprimento da capilar e a voltagem foram os fatores otimizados por análise multivariada. Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial fracionado $2^{(4-1)}$ com triplicata no ponto central como triagem para a observação de fatores de significância estatística ($\alpha = 0,05$) no domínio selecionado. Ainda, foi implementada para avaliar o impacto na separação de HYP a metodologia de superfície de resposta Doehlert (SRM) em três níveis para a concentração de β -CD e cinco níveis para a temperatura, com triplicata no ponto central. A matriz de contraste de ambos os planejamentos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Estratégia de desenvolvimento de método multivariada (A) níveis dos fatores e contrastes utilizados para um planejamento fatorial fracionado de $2^{(4-1)}$ e (B) Metodologia de superfície de resposta Doehlert, ambos realizados em triplicata do ponto central.

(A) Exp.	[β -CD] (mmol L ⁻¹)	Capilar (cm)	Temp. (°C)	Voltagem (kV)	(B) Exp.	Temp. (°C)	[β -CD] (mmol L ⁻¹)
1	5.0 (-)	48.5 (-)	15.0 (-)	20 (-)	1	20.0 (+1)	10.0 (0)
2	10.0 (+)	48.5 (-)	15.0 (-)	30 (+)	2	10.0 (-1)	10.0 (0)
3	5.0 (-)	64.5 (-)	15.0 (-)	30 (+)	3	12.5 (-0.5)	7.5 (-0.866)
4	10.0 (+)	64.5 (-)	15.0 (-)	20 (-)	4	17.5 (+0.5)	7.5 (-0.866)
5	5.0 (-)	48.5 (-)	25.0 (+)	30 (+)	5	17.5 (+0.5)	12.5 (+0.866)
6	10.0 (+)	48.5 (-)	25.0 (+)	20 (-)	6	12.5 (-0.5)	12.5 (+0.866)
7	5.0 (-)	64.5 (-)	25.0 (+)	20 (-)	7 (C)	15.0 (0)	10.0 (0)
8	10.0 (+)	64.5 (-)	25.0 (+)	30 (+)	8 (C)	15.0 (0)	10.0 (0)
9 (C)	7.5 (0)	56.5 (0)	20.0 (0)	25 (0)	9 (C)	15.0 (0)	10.0 (0)
10 (C)	7.5 (0)	56.5 (0)	20.0 (0)	25 (0)			
11 (C)	7.5 (0)	56.5 (0)	20.0 (0)	25 (0)			

Fonte: o próprio autor.

A variável dependente foi elaborada como um fator de resposta (RF), que pode ser visto na Equação 4, onde R_s representa a resolução entre o sinal de HYP e o pico adjacente mais próximo, t_{HYP} foi o tempo de migração de HYP em minutos e $H_{(HYP/IS)}$ a razão entre a altura do pico de HYP e o IS, CHES, de cada corrida.

$$RF = \frac{R_s H_{HYP}}{t_{HYP} IS} \quad (4)$$

As significâncias dos fatores foram avaliadas pelos gráficos de Pareto, gerados por suas respectivas análises de variância (ANOVA). As condições de compromisso foram obtidas pelos valores críticos retornados pelo modelo. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a normalidade dos resíduos do SRM Doehlert (Shapiro e Wilk, 1965). As análises estatísticas e superfície de resposta foram realizadas no Statistica (versão 13.5, TIBCO, Palo Alto, EUA).

4.5 AMOSTRAS DE PRODUTOS CÁRNEOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Foram analisadas um total de 21 amostras, incluindo 11 suplementos de colágeno (mistura de pó para bebidas com sabor, comprimidos, cápsulas, gelatina e colágeno a granel) e 10 produtos cárneos (linguiças paio, calabresa, *brühwurst*, salsicha, mortadela, patê e presunto). A linguiça *brühwurst* foi obtida do Escritório de referência alemão para testes de proficiência em alimentos (DRRR) (traduzido do alemão, *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien*) RVEP 210563 e teve sua utilização como amostra para avaliação da exatidão. A informação de local de aquisição, embalagem e ingrediente rotulado como fonte de colágeno estão dispostas no Quadro 1. As demais amostras foram adquiridas no mercado local brasileiro. As amostras de produtos cárneos foram moídas e congeladas (-20 °C) antes dos experimentos. Os resultados das amostras, em termos de concentrações de COL, foram encontrados multiplicando por um fator de 8 vezes a concentração de HYP contida em 100 g da amostra (Kolar, 1990).

Quadro 1 – Produtos cárneos e suplementos alimentares do mercado brasileiro e suas informações de embalagem e rotulagem sobre a principal fonte de colágeno

Amostra	Aquisição	Ingrediente rotulado como fonte de colágeno
Cápsula (óleo)	Produtos naturais - embalado	Colágeno hidrolisado
Pílula A	Compra online - embalado	Tipo II não desnaturado
Pílula B	Compra online – embalado	Peptídeos proprietários
Pílula C	Farmácia – Blister	Colágeno hidrolisado
Preparado para bebida em pó A	Produtos naturais – sachê	Peptídeos proprietários
Preparado para bebida em pó B	Produtos naturais – sachê	Tipo II não desnaturado e peptídeos
Preparado para bebida em pó C	Produtos naturais - sachê	Tipo II não desnaturado e peptídeos
Preparado para bebida em pó D	Compra online – embalado	Colágeno hidrolisado
Preparado para bebida em pó E	Produtos naturais – sachê	Nenhum (vegetal)
Gelatina hidrolisada	Supermercado – envelope	Colágeno hidrolisado
Colágeno hidrolisado	Produtos naturais – a granel	Colágeno hidrolisado
Fiambre	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Patê	Supermercado – sachê	Carne
Linguiça A (calabresa)	Supermercado – a granel	Carne e CMS
Linguiça B (calabresa)	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Linguiça C (calabresa)	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Linguiça D (paio)	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Linguiça E (<i>brühwurst</i>)	DRRR - RVEP 210563	-
Mortadela A	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Mortadela B	Supermercado – embalado	Carne e CMS
Salsicha	Supermercado – embalado	Carne e CMS

Fonte: o próprio autor.

4.5.1 Procedimento de Hidrólise das amostras

As amostras foram hidrolisadas de acordo com o método AOAC 990.26, com algumas adaptações. Amostras de suplementos alimentares foram moídas e transferidas em quantidades de $0,20 \pm 0,05$ g para tubos de hidrólise com tampa. Um volume de 1,5 mL de ácido sulfúrico $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado a cada tubo. Em frasco fechado, o conteúdo foi agitado e aquecido em uma estufa a $105,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ por 16 horas. Os hidrolisados foram resfriados à temperatura ambiente e filtrados. Os volumes foram completados com água até 25,0 mL em balões volumétricos.

As amostras de produtos cárneos foram moídas e submetidas a um procedimento de hidrólise semelhante. Quantidades de $1,00 \pm 0,01$ g foram pesadas nos tubos de hidrólise. Volumes de 7,5 mL de ácido sulfúrico $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados a cada tubo. Por fim, os hidrolisados foram transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL, lavando os frascos com água até avolumar.

4.5.2 Limpeza dos hidrolisados das amostras

Alíquotas de 100 μL dos hidrolisados de suplementos alimentares ou 200 μL dos hidrolisados de produtos cárneos foram transferidas para microtubos de polipropileno de 2 mL contendo carbonato de estrôncio (SrCO_3). A massa de SrCO_3 foi determinada registrando o pH e a corrente, após sucessivas adições a uma amostra hidrolisada de suplemento alimentar. Para suplementos alimentares foram necessário 35 mg e proporcionalmente 105 mg para produtos cárneos. Em seguida, foram adicionadas soluções aquosas do IS e BUT para atingir concentrações de 100 mg L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em um volume total de 1 mL. Devido a baixa solubilidade do SrCO_3 , as suspensões formadas precisaram ser centrifugadas a $14.100 \times g$ (centrífuga Eppendorf modelo MiniSpin Plus, Hamburgo, Alemanha) por três minutos, e o sobrenadante foi então analisado no sistema de CE.

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA

A validação foi realizada de acordo com as diretrizes da Eurachem, AOAC International e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)

(AOAC Internacional, 2016; Brasil, 2016; Magnusson, 2014). Inicialmente, a seletividade foi verificada experimentalmente com uma mistura padrão de HYP e 20 AA como principais espécies interferentes. A seletividade do método também foi avaliada por meio da análise de amostras reais e pela utilização de um método comparativo de LC-MS/MS.

O efeito de matriz foi avaliado comparando as inclinações entre as curvas analíticas de soluções padrão aquosas e as de adição de padrão para suplementos alimentares e produtos cárneos. As curvas analíticas de adição de padrão foram preparadas com uma amostra composta por uma mistura de proteínas de amêndoa e ervilha (suplemento à base de plantas - pó para bebidas E) e hidrolisados de salsicha diluídos. As curvas analíticas aquosas foram preparadas em seis níveis de concentração ($n = 18$) e as curvas analíticas de adição de padrão em sete níveis de concentração ($n = 21$), ambas em triplicatas na faixa de trabalho. Os dados foram tratados em um modelo de regressão linear baseado no método dos mínimos quadrados ordinários. A análise de variância das inclinações foi realizada por meio dos testes F e t ($\alpha = 0,05$). A falta de ajuste foi avaliada pelo teste F. A avaliação do efeito de matriz também considerou a razão entre as inclinações médias para cada calibração (Hoff *et al.*, 2015).

A linearidade foi analisada aleatoriamente para as curvas analíticas externas aquosas com três replicatas independentes para cada nível, na faixa de trabalho de 26,8 a 160,8 mg L⁻¹ e 5,8 a 58 mg L⁻¹ ($n = 18$), respectivamente, para as duas matrizes distintas. Esse parâmetro foi avaliado por meio de suas faixas lineares, sensibilidades, coeficientes de determinação (R^2) e falta de ajuste (Sneydecor e Cochran, 1989). A aleatoriedade dos resíduos de regressão foi verificada. A homogeneidade das variâncias dos resíduos foi determinada pelo teste de Levene, e a normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk (Levene, 1960; Shapiro e Wilk, 1965). Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) foram determinados considerando a relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente (AOAC Internacional, 2016).

A precisão foi avaliada pela repetibilidade em um único dia experimental, em três níveis de concentração (baixa, média e alta). A precisão intermediária foi verificada nos mesmos níveis de concentração em três dias experimentais diferentes para ambas as matrizes (Brasil, 2016). A precisão para cada nível foi avaliada a partir do CV para a razão de área e a razão de tempo de migração entre HYP e o IS apropriado.

A recuperação foi avaliada adicionando a solução padrão de HYP à mistura de origem vegetal hidrolisada e à salsicha frankfurter nos mesmos três níveis de concentração mencionados anteriormente. Os valores foram relatados como uma razão percentual entre o teor de HYP quantificado e o teor de HYP adicionado. Além disso, os teores médios de colágeno (g/100 g) de uma linguiça *brühwurst* e de uma amostra de preparado para bebida em pó A foram quantificados em triplicata pelo método proposto. Esses teores também foram avaliados pelo método de LC-MS/MS descrito na seção 4.2.2. A equivalência estatística dos resultados médios foi verificada pelo teste t pareado.

5 RESULTADOS

A seção de resultados foi dividida em subitens dedicados exclusivamente para individualizar cada uma das proposições deste trabalho. Como já mencionado, anteriormente, o estudo da quantificação do P2C para obter o teor de colágeno, ainda não foi reportada na literatura. Uma série de desafios analíticos podem ser simplificados com o sucesso da oxidação da HYP a um composto estável e detectável. Diferentemente da implementação de um derivatizante, a oxidação promoveria modificações dirigidas a determinados grupamentos funcionais, tornando o procedimento mais seletivo. A possibilidade do produto ser uma substância não zwitterionica e cromófora na região do UV, minimizaria a interferência de aminoácidos que absorvem esta radiação. Ainda, o mecanismo de CZE, beneficia-se da viabilidade de selecionar a região de pH de trabalho, priorizando maior abundância do analito e, concomitantemente, inviabilizando a migração dos interferentes na mesma escala de tempo, segregando-os pela natureza de sua carga ou neutralidade.

Assim como a proposta supracitada, apresenta-se nesta seção a determinação da HYP por método indireto, que não teve registros na literatura com a finalidade de determinação do teor de colágeno. A vantagem do sucesso desta estratégia seria a de estar a apenas uma etapa da proteína colagênica, a hidrólise. O que, em teoria, reflete em uma abordagem com menor probabilidade de erros e perdas por reações de baixa eficiência e rendimento. O menor número de etapas reflete também no custo e redução na variedade e consumo de reagentes para viabilidade da análise. A contrapartida desta tomada de decisão é o maior investimento no desenvolvimento do método e eletroferogramas ricos em sinais de aminoácidos, seja do colágeno como de outras proteínas advindas das matrizes cárneas.

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO

5.1.1 Determinação do pK_a aparente e mobilidade do ácido pirrol-2-carboxílico

Diante da ausência de informações sobre a mobilidade do P2C na literatura objetivou-se, inicialmente, em realizar ensaios para determiná-la. Os experimentos e subsequente cálculo das mobilidades eletroforéticas foram realizados pelo método de

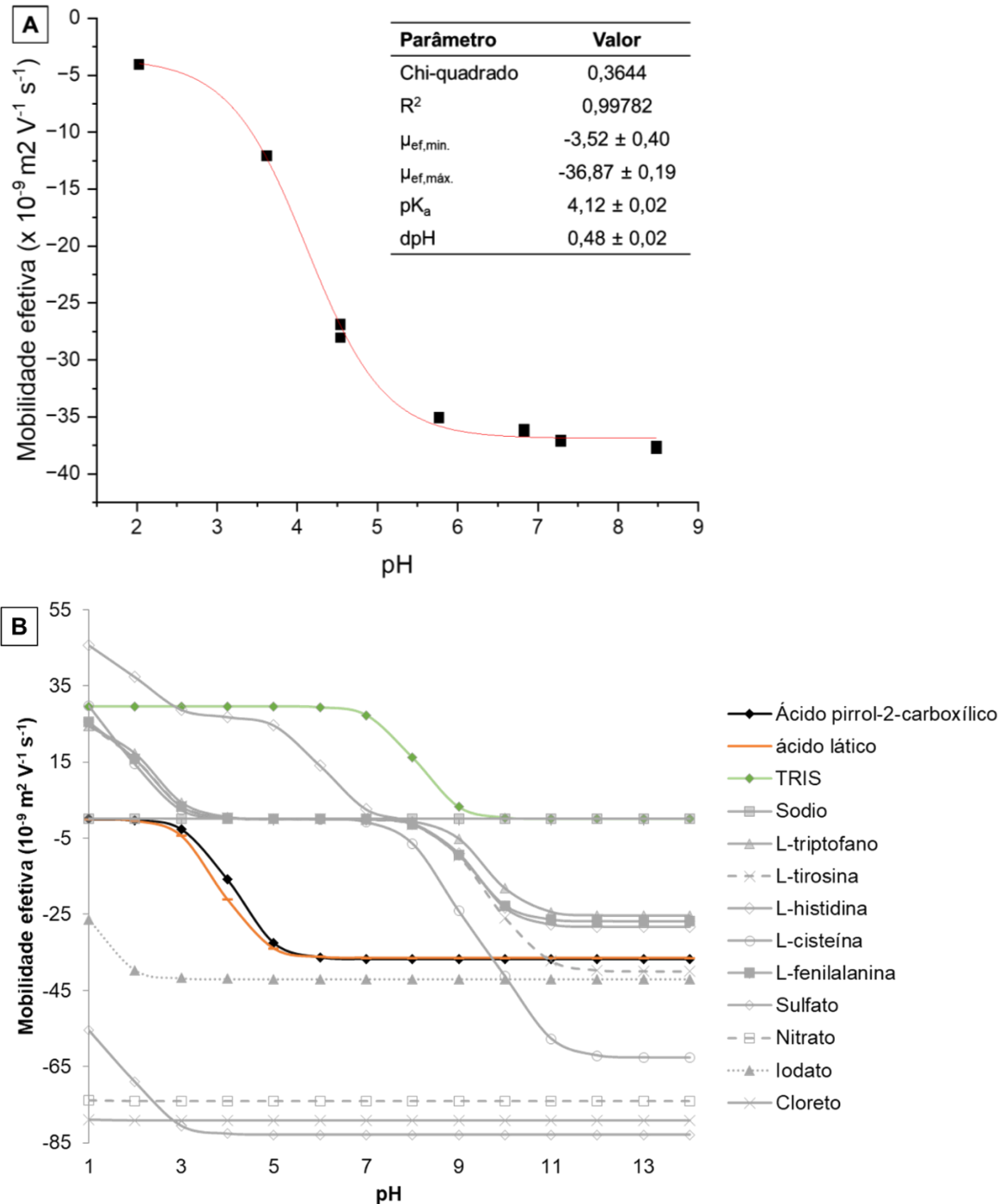
Williams & Vigh (1996) e subsequente correção pela equação de Onsager-Fuoss, dada a força iônica dos tampões em cada pH avaliado. Esta é uma prática bem estabelecida e com alta acuidade na determinação de mobilidades efetivas (Malý *et al.*, 2020). A descrição detalhada do procedimento, equacionamento, eletroferogramas e mobilidades efetivas para cada condição de pH entre 2,0 e 8,5 estão dispostas no Apêndice A, Tabela A1 e Figura A1.

Para uma caracterização mais precisa da $\mu_{ef, P2C}$, e de seu pK_a , foi verificado o ajuste dos dados experimentais da relação entre a $\mu_{ef, P2C}$ em função do pH, utilizando diversos modelos matemáticos. Dentre os avaliados, os dados tiveram maior correlação (R^2 de 0,998) com o modelo caracterizado pela função sigmoideal de Boltzman, que está apresentada pela Equação 5. A relação gráfica, bem como os parâmetros encontrados pela função de Boltzman estão reportados na Figura 10.

$$\mu_{ef} = \mu_{efm\acute{a}x.} + \frac{\mu_{efmin.} - \mu_{efm\acute{a}x.}}{1 + e^{\frac{pH - pK_a}{dpH}}} \quad (5)$$

Por possuir comportamento eletroforético conhecido, o ácido benzóico foi utilizado como controle. O cálculo da mobilidade para esta substância retornou $-35,2 \pm 0,13 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a 23°C), que representou um erro relativo de 4,7% ($-33,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Esta estimativa de variação foi extrapolada a todas as medidas reportadas por este método. Pela curva de mobilidade versus pH apresentada na Figura 10 A, verificou-se que no intervalo de pH entre 5,5 e 8,5 foi observada variação de 3,2% para a $\mu_{ef, P2C}$, o que evidenciou sua mobilidade limite. Pela Figura 10 A verifica-se pelo modelo sigmoideal de Boltzman um valor de $\mu_{ef, P2C}$ igual a $-36,87 \pm 0,19 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Apenas uma inflexão foi observada na curva, uma característica de ácidos orgânicos fracos e monoproticos, cuja dissociação do próton são respectiva a carbonila. O ponto característico ao pK_a propicia a coexistência das espécies no equilíbrio, em uma proporção de 50% (Vleugels *et al.*, 2018). O valor de pK_a encontrado para o P2C pelo modelo de Boltzman foi de $4,12 \pm 0,02$ ($\pm 4,7\%$, a 23°C). Notario *et al.* (1998) determinou em fase gasosa o pK_a de 4,36 para o P2C. Comparativamente, o P2C é um ácido mais fraco que o composto de referência, o ácido benzóico (pK_a 4,19), por isso, seu pK_a deve ser mais elevado. Pois ocorre uma menor estabilização por ressonância e, pelo efeito doador do par de elétrons do nitrogênio do pirrol não há favorecimento da estabilização de sua base conjugada.

Figura 10 – Descrição matemática da curva de mobilidade efetiva do ácido pirrol-2-carboxílico versus o pH pelo modelo sigmoidal de Boltzmann (A).



5.1.2 Otimizações *in silico* das condições de análise do ácido pirrol-2-carboxílico

A inclusão das informações de mobilidade e pK_a para o P2C no software Peakmaster viabilizou a simulação e otimização das condições de separação. Foram

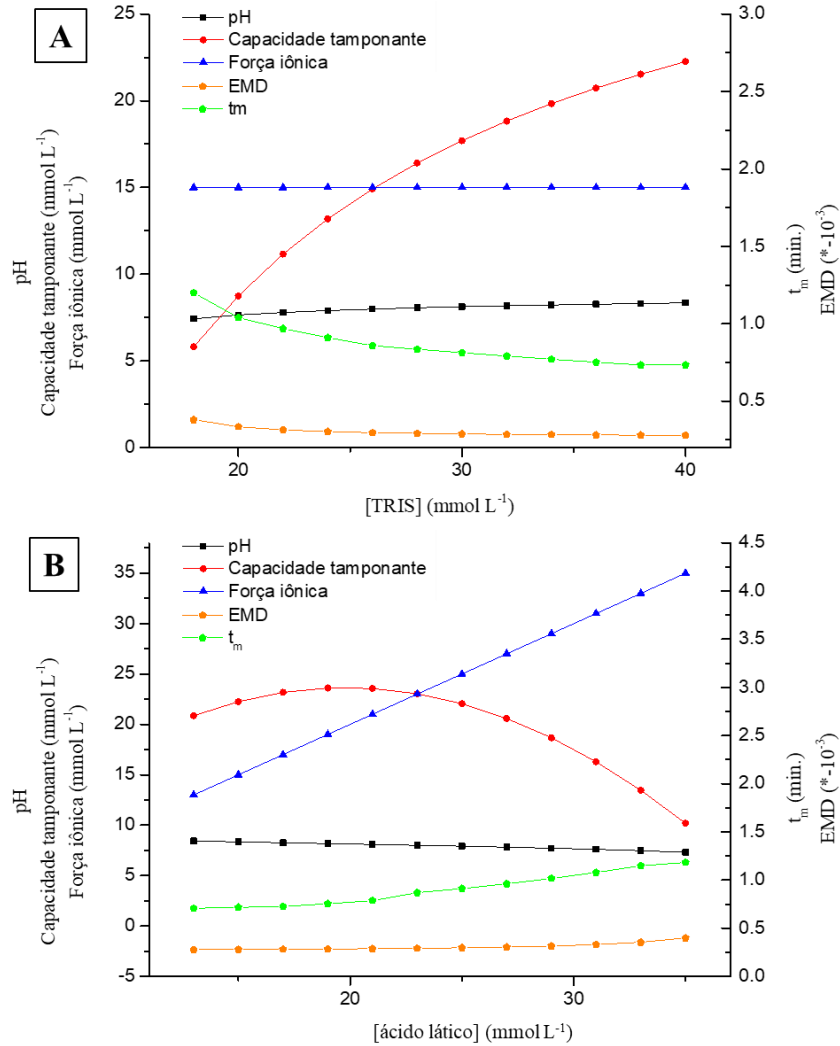
levantados os principais interferentes advindos da hidrólise de matrizes com alto teor proteico, os aminoácidos, limitando-se aos que absorvem radiação UV. Podem ser visualizadas na Figura 10 B, as curvas de mobilidade do P2C, inclusive de supostos interferentes inorgânicos comuns ao procedimento proposto e aos aditivos alimentares comuns a tecnologia de alimentos. A análise evidenciou a região de pH que retornou maior diferença de mobilidades (Tavares e McGuffin, 1994). Pela avaliação gráfica verificou-se que a região apropriada para a separação do P2C foi entre pH 6,0 e 8,0. Em pH 6,0 o P2C atinge mobilidade máxima, diante do domínio experimental avaliado. A natureza zwitterionica dos aminoácidos, entre o pH 3,0 e 8,0 os condicionam as suas formas neutras, migrando junto ao EOF. Ainda, no pH 8,0 a separação beneficia-se de uma mobilidade do fluxo mais elevada, sem utilizar de pHs em que os aminoácidos interferentes estivessem em sua forma aniônica. Por este motivo, o pH 8,0 foi selecionado como condição de compromisso.

Para satisfazer a capacidade tamponante nesta condição de pH, o TRIS (pK_a 8,1) foi selecionado como contra-íon. O ácido láctico (pK_a 3,86) foi o co-íon selecionado por ser um ânion não cromóforo e, especialmente, pela sua mobilidade iônica ($-36,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ser próxima a do P2C, minimizando a EMD. Suas concentrações ótimas foram selecionadas mediante maior capacidade tamponante, menor força iônica e EMD, podendo ser visualizadas na Figura 11 A e B. Tais critérios foram respeitados com 20 e 40 mmol L⁻¹ de ácido láctico e TRIS, respectivamente.

Com o pH de separação e os componentes do BGE selecionados, optou-se pela migração do P2C em modo contraeletrosmótico, com sua introdução pela extremidade próxima a janela de detecção (do inglês, *short end injection*), de comprimento de 8,5 cm. Capilares de comprimento mínimo (32 cm) foram suficientes para a fixação no cassete.

Visando minimizar oscilações instrumentais, associadas principalmente ao volume de amostra variável introduzido no CE, optou-se pela padronização interna (Vieira et al., 2021). Inicialmente, os candidatos a IS foram escolhidos pela base de dados do Peakmaster, porém dentre os analisados, nenhum foi adequado, retornando com migrações ou aumento significativo do tempo de análise. Experimentalmente, alguns padrões foram analisados e o ácido clorogênico foi escolhido como IS.

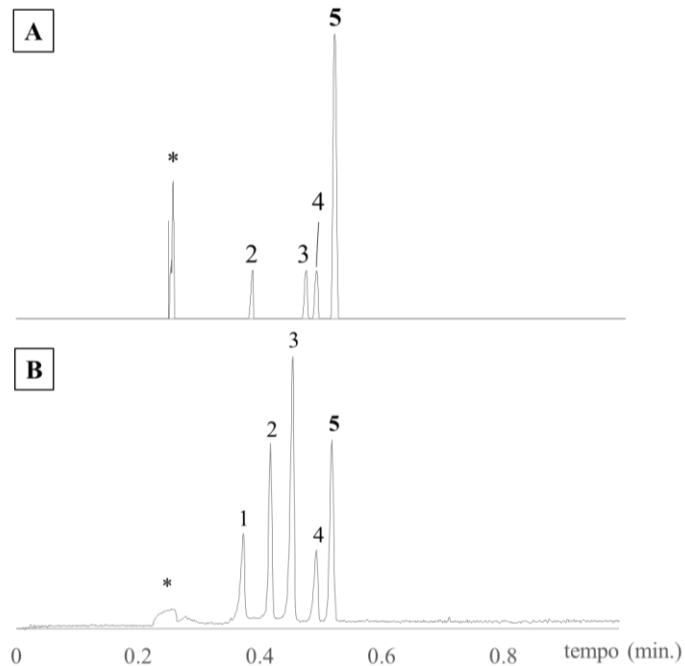
Figura 11 – Otimização das concentrações do contra-íon e co-íon. A concentração do contra-íon, TRIS, foi avaliada de 18 a 40 mmol L⁻¹, com o co-íon fixado em 15 mmol L⁻¹ (A). A condição selecionada foi então fixada para a avaliação da concentração do co-íon, ácido láctico, de 16 a 36 mmol L⁻¹ (B). Foram avaliados os parâmetros para o BGE como a força iônica, capacidade tamponante e o pH, além de variáveis para o analito como a mobilidade e EMD.



Fonte: o próprio autor.

Por fim, a simulação e a reprodução experimental foram realizadas, partindo de soluções padrão de P2C, IS, e os interferentes: histidina, fenilalanina, triptofano, tirosina e cisteína, além do ácido ascórbico, sórbico e nicotínico utilizados respectivamente como antioxidante, conservante e realçador de cor em produtos cárneos. Os eletroferogramas resultantes estão apresentados na Figura 12.

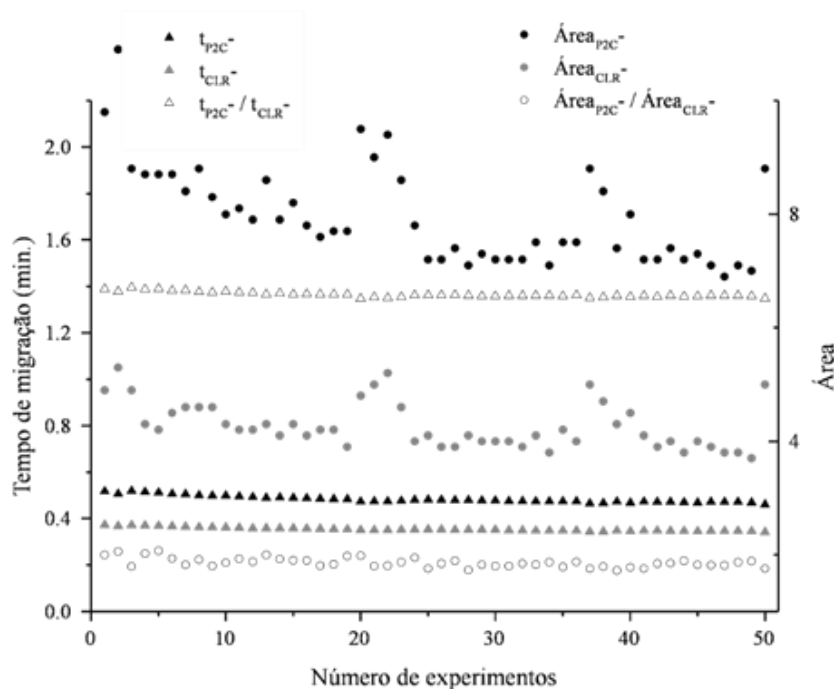
Figura 12 – Eletroferogramas de padrões observados por simulação (A) e análise real (B). Sinais referentes ao: triptofano, tirosina, cisteína, histidina e fenilalanina (*), ácido clorogênico (IS, 1), ascórbico (2), sórbico (3), nicotínico (4) e pirrol-2-carboxílico (5); Experimental: capilar de sílica de 32 e 8,5 cm (50 μm d.i., 375 μm d.e.), polaridade negativa (-30 kV), injeção a -50 mbar por 5s e detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico e trishidroximetilamônio 20:40 mmol L⁻¹ pH 8,1.



Fonte: o próprio autor.

Como pode ser visualizado nos eletroferogramas simulado e experimental, todos os aminoácidos cromóforos, em suas formas zwitterionicas, foram carregados pelo EOF. Em caso dos aditivos alimentares conservantes como ascorbato e sorbato resistirem a hidrólise, eles seriam separados do P2C. Embora o ácido nicotínico apresente-se em baixos níveis em carnes, foi também considerado nesta avaliação, porém não comprometeria a seletividade do método. Com esta tomada de decisão, houve intervalo de tempo para a separação sob máxima tensão de -30kV, sem comprometer a seletividade. A separação beneficiou-se da absorvidade máxima do P2C, em 255 nm, onde a dos aminoácidos cromóforos foi baixa. A migração subminuto do P2C foi de aproximadamente 30 segundos. A repetitividade da área e do tempo de migração foram avaliadas ao longo de 50 corridas e os valores estão expostos no Figura 13. Para a área do P2C, foram observadas variações superiores a 20%. A área retornada para o ácido clorogênico, o IS, passou por oscilações de mesma magnitude, sendo possível normalizar a área do P2C e proporcionar repetitividade adequada. A variação pode ser justificada pela oscilação no volume de injeção, experimentada nos instrumentos de eletroforese capilar convencionais.

Figura 13 – Repetitividade em análises consecutivas ($n = 50$) para monitoramento do tempo de migração, em minutos, e área do ácido pirrol-2-carboxílico (analito) e do ácido clorogênico (padrão interno), além da normalização de ambos, acessada pela razão do valor da grandeza do analito pela do padrão interno. Condições de análise: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 8,5 cm (50 mm d.i., 375 mm d.e.), polaridade negativa, voltagem de separação -30 kV, injeção hidrodinâmica por pressão de -50 mbar por 5s, detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico 20 mmol L⁻¹ e trishidroximetilamônio 40 mmol L⁻¹ pH 8,2.



Fonte: o próprio autor.

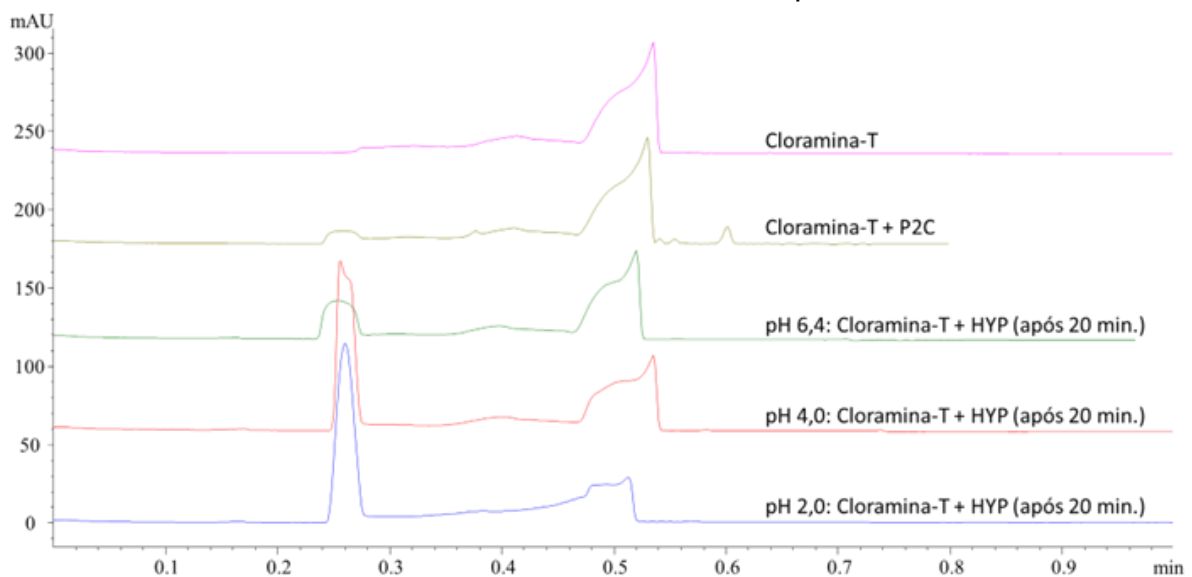
5.1.3 Aplicação do método e investigação dos produtos da reação

Com as condições definidas para o método de separação, uma amostra simulada, composta pelo padrão de HYP, dissolvida em ácido sulfúrico 3,5 mol L⁻¹ e oxidada com cloramina-T, preparada em solução tampão nas condições do método AOAC 990.26. Tal estratégia é praticada na curva analítica pelo método oficial, no qual o analito passa por todas as etapas, até ser derivatizado e analisado (Kolar, 1990). O IS não foi exposto as condições de análise para simplificação da interpretação. Os eletroferogramas resultantes dos padrões de cloramina-T, P2C e a variação do pH do meio reacional com ácido perclórico estão elencados na Figura 14.

Primeiramente, pode-se observar pelos eletroferogramas da Figura 14, que a análise do padrão isolado da cloramina-T e da sua mistura com P2C, caracterizaram sinais em tempos de migração específicos para cada substância, não havendo sobreposição. Os eletroferogramas subsequentes, de pH 6,4 a 2,0 foram replicadas

com adição de quantidades crescentes de ácido perclórico. No método oficial, o ácido tem a função de solubilizar o derivatizante. Porém, houve correlação do aumento da concentração de ácido e diminuição do excesso de cloramina-T, evidenciado pela redução da área do pico respectivo ao oxidante, após o término dos 20 minutos requeridos para a etapa de oxidação. Foi perceptível o aparecimento de um sinal no tempo do EOF, proporcional a adição de maiores quantidades do ácido.

Figura 14 – Eletroferogramas respectivos ao método de eletroforese capilar de zona para monitorar a formação de ácido pirrol-2-carboxílico a partir da reação sintética de oxidação da trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) com cloramina-T (CAT). De cima para baixo constam os resultados para a análise da solução padrão de CAT, HYP, mistura reacional em pH 6,4, 4,0 e 2,0, todas após 20 min. O pH foi reduzido por adição de ácido perclórico. Condições de análise: capilar de sílica fundida com comprimento total de 32 cm e efetivo de 8,5 cm (50 mm d.i., 375 mm d.e.), polaridade negativa, voltagem de separação -30 kV, injeção hidrodinâmica por pressão de -50 mbar por 5s, detecção em 255 nm; BGE: ácido láctico 20 mmol L⁻¹ e trishidroximetilamônio 40 mmol L⁻¹ pH 8,2.



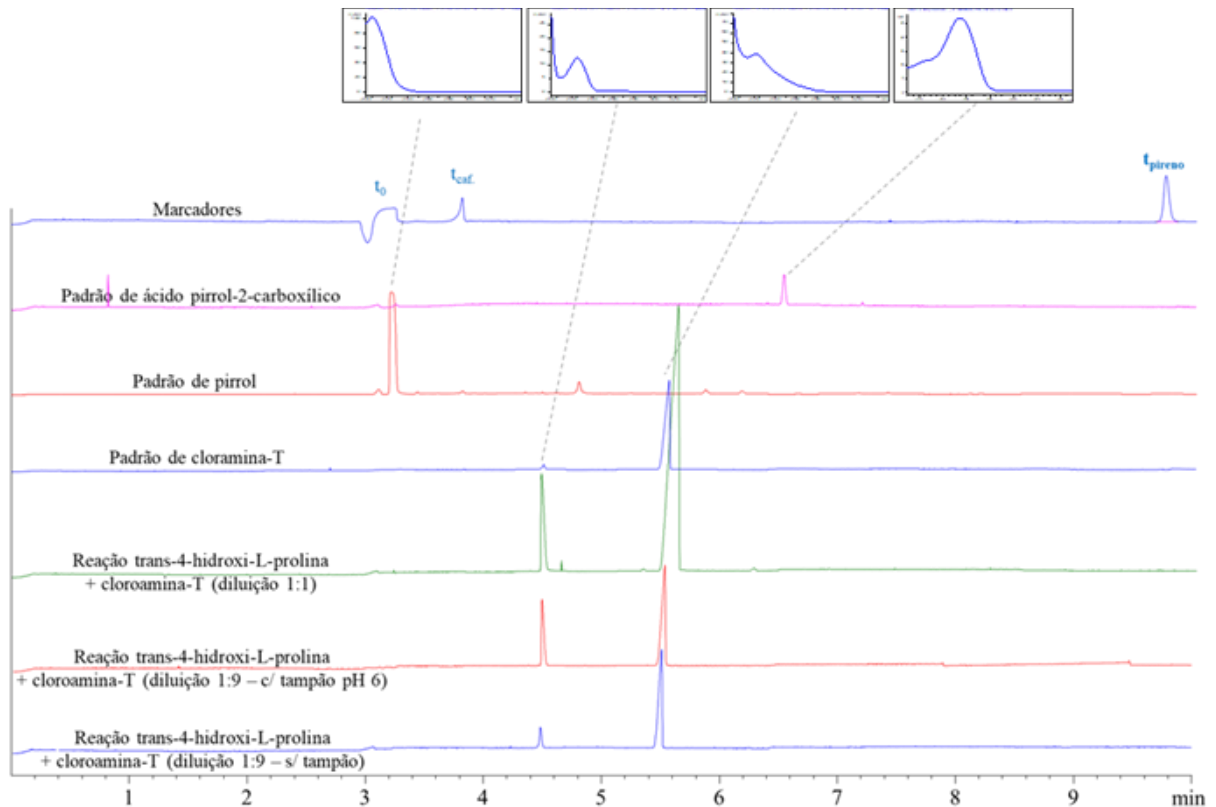
Fonte: o próprio autor.

O teste supracitado foi um exemplo dentre diversos ensaios que objetivaram evidenciar a formação do P2C. Outras condições reacionais foram exploradas, ora neutralizando o hidrolisado previamente a oxidação, utilizando ou não tampão, e em quantidades variadas de HYP e cloramina-T. Em todos os casos foram evidentes apenas os sinais respectivos ao excesso de cloramina-T e os carregados junto ao tempo de migração do EOF. Porém nenhuma foi coincidente com o padrão de P2C.

Além do método de CZE desenvolvido, foram utilizadas outras ferramentas para elucidar a identidade de um ou mais sinais que se apresentaram sobrepostos no

tempo do EOF. Foi utilizado um método de MECK-DAD voltado a separar espécies pela interação com micelas de SDS em meio básico. Especialmente, interessante para a separação de compostos neutros. Inclusive, o padrão de pirrol foi incluído nesta avaliação para averiguar a identidade de possíveis comigrações, que tem potencial para serem separadas por este método. Os cromatogramas eletrocínéticos micelares estão dispostas na Figura 15.

Figura 15 - De cima para baixo estão apresentados cromatogramas eletrocínéticos micelares de uma mistura de marcadores de fluxo, micelar e um composto neutro, a cafeína. Em seguida, os padrões de ácido pirrol-2-carboxílico e pirrol individuais. E por fim, a mistura reacional em diferentes proporções e diluições. Condições de análise: capilar de 60 cm, 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.). Eletrólito: 20 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio e dodecilsulfato de sódio 100 mmol L^{-1} em pH 9,0.



Fonte: o próprio autor.

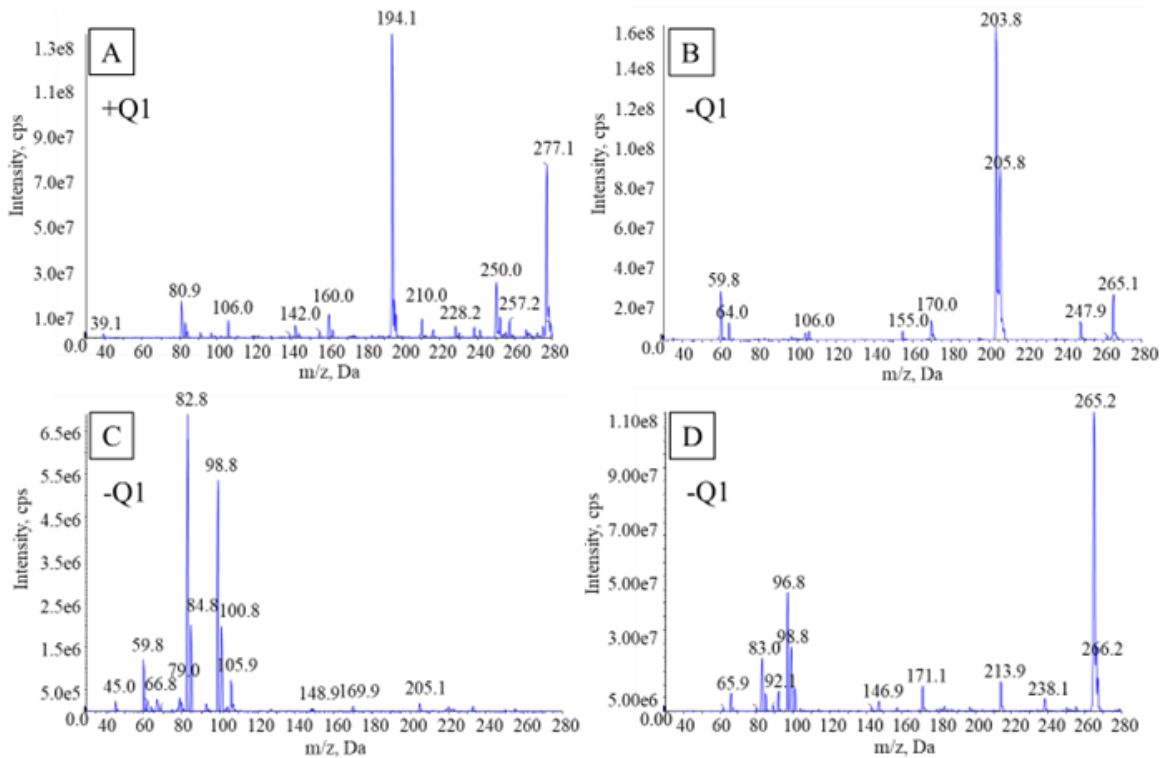
Os marcadores, acetona e pireno foram utilizados para demonstração da janela de separação, respectivamente, substâncias de baixa e alta intensidade de interação com a micela de SDS. A cafeína foi utilizada como prova de conceito e funcionamento da retenção, a qual apresentou pico com retenção característica.

A análise dos padrões de pirrol e P2C retornaram sinais com tempo de retenção característico que não tiveram correspondência com os resultantes da

análise do meio reacional. A retenção do pirrol foi pouco significativa neste sistema. Os cromatogramas eletrocinéticos micelares das amostras demonstraram retenção para 2 sinais majoritários, cujos espectros tiveram alta similaridade com os observados pelo método de CZE. Para a mistura reacional, ambos os sinais por MECK, retornaram mesmo tempo de eluição e espectro UV que os sinais de menor e maior intensidade encontrados no padrão de cloramina-T. Sugerindo que além do sinal respectivo ao padrão de cloramina-T, o outro pode ser originário desta.

Considerando a limitação dos métodos utilizados, quanto a detectabilidade, especialmente para compostos que apresentam impossibilidade de absorção de radiação UV, recorreu-se a infusão direta da mistura reacional na espectrometria de massas em ambas as polaridades, para também identificar um dos sinais resultantes da MECK. Foram registrados espectros no modo de varredura com polaridade negativa e positiva com os íons quasimoleculares e adutos não filtrados pelo quadropolo (Q1). Os espectros estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Hidrolisado neutralizado e oxidação sem tampão no modo positivo (A) e no modo negativo (B). E comparativo entre a reação de oxidação em pH 2,0 (C) e o padrão de pirrol (D) no modo negativo de ionização.



Fonte: o próprio autor.

Da ionização no modo positivo, exibida na Figura 16 A e das evidências encontradas, anteriormente, observou-se a presença de um aduto em 194 m/z $[M+Na]^+$, oriundo do sódio com a p-toluenosulfonamida ($171,21 \text{ g mol}^{-1}$), gerada após a liberação do cloro eletrofílico por parte da cloramina-T. Com isto, a identidade do sinal que comigrou com o fluxo eletroosmótico no método CZE pode ser atribuído a p-toluenosulfonamida, pois nas condições de análise apresentava-se neutra (pK_a 10,17), e por este motivo exibiu retenção na MECK.

Para o espectro gerado pela ionização no modo negativo, apresentado na Figura 16 B, foi observado o pico base em 203,8 m/z, cuja m/z coincide com a do íon quasimolecular $[M-H]^-$ da cloramina-T ($227,64 \text{ g mol}^{-1}$), após a abstração do sódio. Alinhado ao resultado da MECK a cloramina-T apresentou-se em maior abundância que a p-toluenocloroamida, especialmente quando o ácido perclórico não foi empregado. Logo, este tem também função de destruir o excesso do oxidante.

Para a reação em pH 2,0, Figura 16 C, o pico base em m/z 83, apresentou-se também no padrão de pirrol, Figura 16 D, porém em quantidades inferiores. Poucas são as evidências sobre a identidade deste sinal e maiores investigações precisariam ser realizadas. Com o suporte da literatura, verificou-se um produto de oxidação originário da reação do pirrol sob peróxido e ácido acético, cuja incorporação de um oxigênio no carbono alfa, atribui m/z coincidente (83), cuja possibilidade de identidade pode estar associada a 2-pirrolidinona insaturada (Bocchi *et al.*, 1970).

Sobre a inviabilidade da detecção do P2C, foram encontradas na literatura observações que podem ser as principais limitações para o insucesso das reações. O P2C pode sofrer reação de descarboxilação, liberação do carboxilato como dióxido de carbono. Na sua forma neutra está sujeito a descarboxilação catalisada por ácido forte, após protonação do carbono alfa (Mundle e Kluger, 2009). Mcanulty (2005), por outro lado, faz menção de formação do P2C na reação em questão, porém assegura a descarboxilação, em sua totalidade, após 100°C por 30 min. A cromatografia em camada delgada da mistura sintética da reação entre a cloramina-T e a HYP não retornou manchas de mesma retenção que o padrão de P2C e, concluiu-se que esta reação não gerou o mesmo produto de oxidação sob peróxido de hidrogênio e sulfato de cobre (Arneith e Hamm, 1970). Um dos autores que fortaleceu a ideia da formação de P2C no trabalho de título "*Conversion of hydroxyproline to pyrrole-2-carboxylic acid*", anos depois retificou esta hipótese, demonstrando evidências da descarboxilação, e geração do pirrol sob condições ácidas (Mani e Radhakrishnan,

1976; Radhakrishnan e Meister, 1957). A descarboxilação do P2C por cálculos computacionais demonstrou ser favorável pelo mecanismo de adição de água a carboxila, seguida da quebra da ligação C-C e subsequente protonação do ácido carbônico (Zhang, Geng e Wang, 2011). Por outro lado, outros estudos de teoria de densidade funcional (DFT) demonstraram dois caminhos reacionais possíveis, o ataque ao carbono alfa ou ao carbono da carboxila, seguido da formação de um anel de quatro membros como estado de transição (CHENG et al., 2010).

Como consequência da inviabilidade de formar o P2C pela reação estudada, foi explorada uma alternativa mencionada previamente, a de detecção UV indireta da HYP. A vantagem de optar por esta estratégia e a de simplificar ainda mais a análise em termos de número de etapas, uma vez que é dispensável a oxidação que o procedimento descrito neste capítulo abordou.

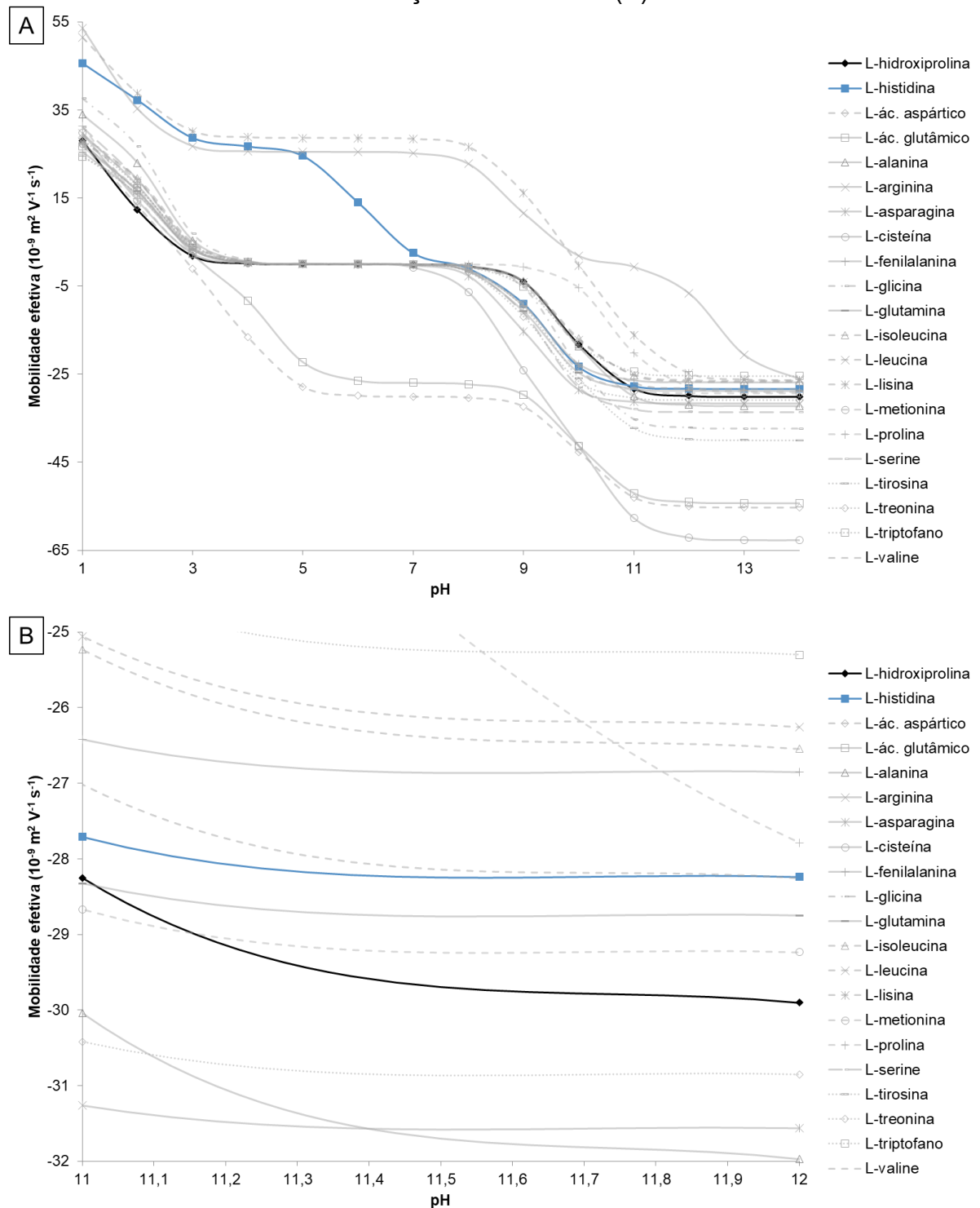
5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA

5.2.1 Estratégia *in silico* para seleção do pH, composição do BGE e padrão interno

Para a detecção UV indireta da HYP, primeiramente, a faixa de pH para a sua separação dos outros aminoácidos precisou ser selecionada. Foram utilizadas curvas de mobilidade efetiva versus pH, que podem ser observadas na Figura 17 A e B. As informações sobre pK_a e μ_{eff} foram coletadas do banco de dados do PeakMaster, que advém das tabelas de Hirokawa et al. (1993).

As curvas indicaram que a forma aniônica da HYP demonstrou maior potencial para ser separada, devido ao menor número de aminoácidos interferentes. Observou-se que a maior diferença de μ_{eff} foi alcançada quando o pH estava acima de 11,3, vide ampliação da curva na Figura 17 B, indicando que o BGE deve ter um valor além deste pH para uma tentativa de separação da HYP ($\mu_{eff(HYP)} \sim -29 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Como a HYP é um zwitterion, seus estados de carga predominantes são evidenciados quando o pH está abaixo do pK_{a1} (1,8), acima do pK_{a2} (9,8) e entre esses valores, apresentando-se, respectivamente, como cátion, ânion e neutra. Ainda, observou-se que os principais interferentes são a L-histidina, L-metionina, L-valina e L-glutamina.

Figura 17 – Curvas de mobilidade efetiva versus pH expressos para 20 aminoácidos e a trans-4-hidroxi-L-prolina (A). Ampliação para avaliação da região onde houve diferença de mobilidade (B).



Fonte: o próprio autor.

Com o conhecimento do pH mais adequado, foi dado prosseguimento na seleção dos componentes do BGE, cuja avaliação foi com base na similaridade do μ_{eff} e na obrigatoriedade de possuir absorvância molar, devido a limitação que a HYP

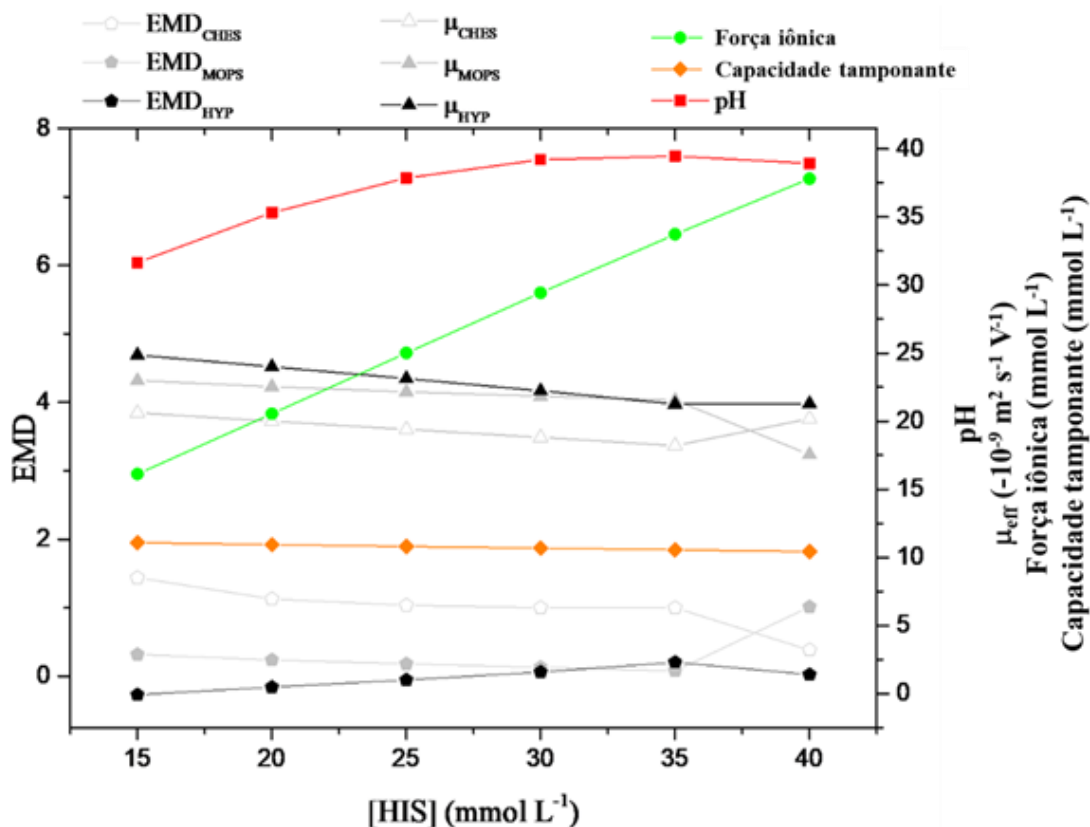
apresenta. Um co-íon cromóforo foi escolhido pelo banco de dados PeakMaster para a detecção adequada da HYP. Os critérios de seleção foram para que o co-íon apresentasse μ_{eff} próxima ao $\mu_{\text{eff (HYP)}}$ para minimizar os fenômenos de EMD e promover uma melhor simetria do sinal. Atendendo a esses critérios, a HIS foi escolhida como co-íon. Como contra-íon, a BUT foi selecionada devido ao seu valor de pK_a (10,8) estar próximo à faixa de pH desejada, garantindo uma capacidade tamponante adequada.

A injeção hidrodinâmica foi utilizada para introduzir a amostra no capilar. Antecipando desvios instrumentais e o impacto sobre a precisão, linearidade e exatidão, uma prática comum para mitigar erros por normalizar a área do analito pela padronização interna (Vieira *et al.*, 2021). CHES e MOPS foram os padrões internos selecionados a partir do banco de dados PeakMaster, por apresentarem mobilidade adequada e nenhuma absorvidade. Experimentos demonstraram que, individualmente, foram adequados como IS para amostras de suplementos alimentares e produtos de carne.

Simulações no PeakMaster foram também úteis para selecionar a concentração dos componentes do BGE e estas podem ser verificadas na Figura 18. De acordo com diferentes proporções de HIS, a condição ideal foi encontrada em 25 mmol L⁻¹, com as condições fixas de BUT em 180 mmol L⁻¹, comprimento da capilar e voltagem. Essas condições foram escolhidas para proporcionar o pH necessário, o mais próximo possível de zero EMD, alta capacidade tamponante e a menor força iônica, considerando a inerência do efeito Joule com aplicação de alta voltagem.

Para as simulações foi utilizado o valor de EOF de $+53 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, uma vez que este é característico de capilares de sílica fundida em pH superior a 10 (Vitali, Fávere e Micke, 2011). Nessas condições, a migração de ânions em que o módulo da mobilidade for inferior ao EOF, como a HYP e os AA no pH 11,4, o modo de separação será contrário ao EOF ou contraeletrosmótico. As simulações demonstraram que HIS foi um co-íon adequado que, ao ser combinado com as condições previamente selecionadas, proporcionou uma boa resolução entre HYP e AA interferentes. Além disso, os dados experimentais mostraram que, devido a estar presente em maior concentração no BGE, a HIS suprimia seus próprios sinais na amostra em 220 nm.

Figura 18 – Otimização das concentrações do co-íon, histidina, de 15 a 40 mmol L⁻¹. Contra-íon fixado em 180 mmol L⁻¹. Foram avaliados os parâmetros para o BGE como a força iônica, capacidade tamponante e o pH, além de variáveis para o analito como a mobilidade e EMD.

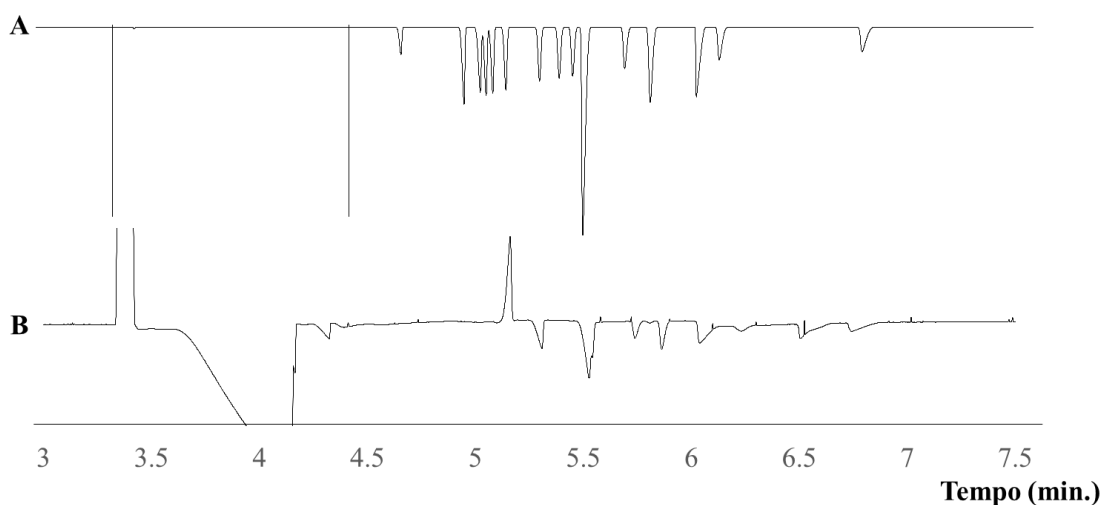


Fonte: o próprio autor.

Embora a otimização e desenvolvimento *in silico* do método tenham sido realizados, corridas experimentais foram conduzidas e os eletroferogramas resultantes mostraram que a HYP não foi completamente separada dos interferentes, como pode ser visualizado na Figura 19. A discrepância entre os dados experimentais e simulados pode ser atribuída ao diâmetro interno do capilar de 75 μm , que permitiu a introdução de volumes de amostra maiores, necessários para alcançar uma detectabilidade adequada em ambas as matrizes. Portanto, foi necessário aprimorar a separação ajustando parâmetros que não podem ser avaliados no PeakMaster, como a inclusão de β -CD como um aditivo ao BGE e a temperatura de separação. Esses fatores geralmente são considerados em sistemas de separação por CE que carecem de seletividade. Em CZE, a redução da temperatura altera a viscosidade do BGE e, conseqüentemente, o coeficiente de difusão do analito e dos interferentes (Knox e McCormack, 1994). Visto que o comprimento do capilar e a voltagem aplicada também foram estudados, mais experimentos eram esperados. Otimizações

multivariadas foram realizadas com o auxílio do planejamento de experimentos, para adequar seletividade requerida nas amostras com a requisição de um reduzido número de experimentos.

Figura 19 – Reprodução das condições otimizadas in silico. Eletroferograma simulado (A) e experimental (B). Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 μm i.d. e 375 μm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Temperatura de 23°C. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L^{-1} de histidina e 180 mmol L^{-1} de butilamina, pH 11,4.



Fonte: o próprio autor.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO COM ANÁLISE MULTIVARIADA

Em CZE a tensão influencia a velocidade de migração de espécies carregadas e, se adequada, contribui para separações com sinais de alta eficiência. No domínio experimental foram avaliadas tensões típicas em CE que variam de 15 a 30 kV, sendo esta última o máximo atingido pelo instrumento. Associado a isto, com um caminho efetivo apropriado, até mesmo moléculas com baixa diferença de mobilidade entre si pode ser segregadas. A resolução de 1,5 entre HYP e os AAs foi alcançada nas simulações com o comprimento de capilar de 48,5 cm. Embora o experimental tenha retornado resolução insuficiente, a interação deste comprimento crítico com outras variáveis poderia retornar resultados promissores. O comprimento de 64,5 cm foi também avaliado, porque além de ser um maior caminho de separação sua disponibilidade comercial nesta especificação é padronizada pelo fabricante.

Separações em meio líquido são afetadas por fatores que modificam a viscosidade do BGE. Os sistemas de CE são termostatizados para minimizar o efeito Jaule. Embora operado comumente em temperatura ambiente, podem trabalhar de 10,0 até 60,0°C, de acordo com fabricantes. Optou-se por estudar a temperatura entre 15°C até 25°C, podendo avaliar condição convencional e outra que reduz a mobilidade das espécies e proporcionar tempo maior para se diferenciarem até a janela de detecção. Combinar extremos de temperatura a inserção de aditivos ao BGE são estratégias para o ganho de seletividade. As características da interação host-guest das CDs as tornam interessantes como aditivos em CZE, por serem ambientalmente amigáveis e possibilitarem segregar moléculas análogas por interações diferenciais resultando na redução da mobilidade. Por destacar-se pela disponibilidade e menor custo dentre as CDs, a β -CD foi escolhida. Com solubilidade limitada a 16,5 mmol L⁻¹ a sua avaliação em temperaturas mais baixas limitaram ao uso em 5 e 10 mmol L⁻¹.

Reduzindo a um baixo número de experimentos e nas condições de máximo e mínimo supracitadas os fatores tensão, temperatura, comprimento de capilar e [β -CD] foram combinados em um planejamento de experimentos fatorial fracionário em dois níveis 2⁴⁻¹. O fator resposta elaborado priorizou as condições que proporcionariam uma separação com maior seletividade e detectabilidade, respectivamente, em relação à R_s entre o sinal de HYP e do interferente adjacente e à relação de altura entre HYP e IS, no menor tempo de análise. A Equação 4, que representa o cálculo do fator resposta, foi apresentada na sessão 4.4.2, assim como a matriz de contraste com os valores dos níveis experimentais. O gráfico de Pareto que foi gerado pela ANOVA está apresentado na Figura 20 A.

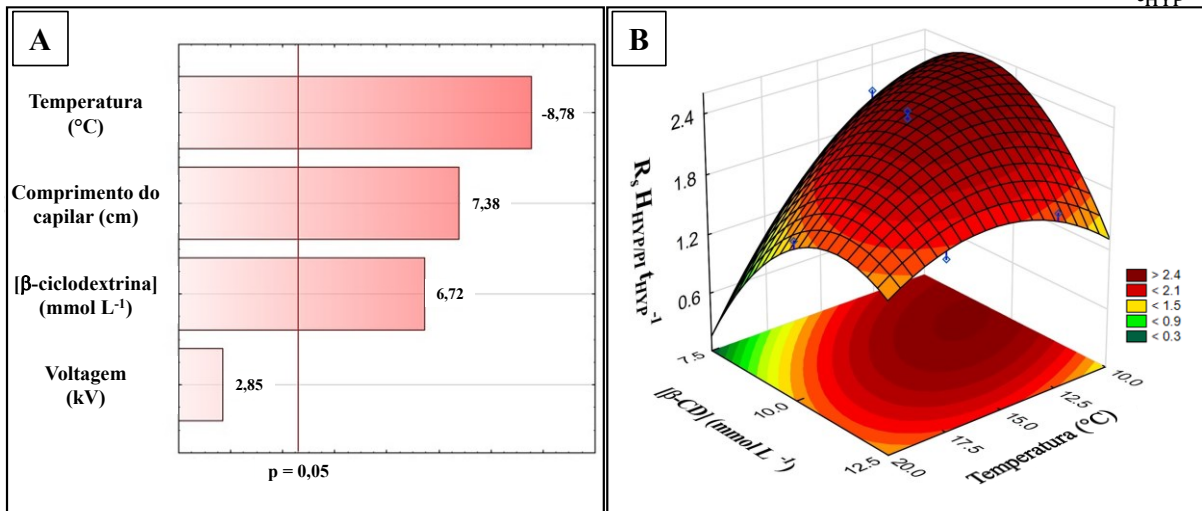
Os resultados demonstraram que a temperatura, o comprimento do capilar e a concentração de β -CD foram estatisticamente significativos ($\alpha = 0,05$). A voltagem não foi significativa, ainda assim conforme indicador positivo na barra de efeitos, a maior voltagem de 30 kV foi selecionada para promover separações em um tempo mais curto. Observou-se tendência em direção a valores mínimos para a temperatura e valores máximos para o comprimento do capilar e a concentração de β -CD. Decidiu-se não avaliar comprimentos de capilar superiores no planejamento Doehlert, uma vez que resoluções adequadas foram alcançadas com capilares de 64,5 cm.

Com um novo domínio, o fator resposta foi novamente utilizado como a variável dependente, desta vez para otimização dos fatores remanescentes pela metodologia de superfície de resposta Doehlert em cinco níveis de temperatura, por

ter sido a variável de maior significância pela interpretação do gráfico de Pareto, e em três níveis de concentração de β -CD (Woźniakiewicz *et al.*, 2017).

Figura 20 – Planejamento de experimentos para o desenvolvimento do método indireto. (A) Gráfico de Pareto ($R^2 = 0.992$) a partir do fatorial fracionário (2^{4-1}) com dois níveis e quatro variáveis (temperatura, comprimento do capilar, concentração de β -ciclodextrina e tensão). (B) Metodologia de superfície de resposta Doehlert ($R^2 = 0.979$) para duas variáveis em três níveis para β -ciclodextrina e cinco para

temperatura. Para o cálculo do fator de resposta foi utilizada a equação: $RF = \frac{R_s H_{HYP}}{IS \cdot t_{HYP}}$



Fonte: o próprio autor.

A ANOVA para o planejamento Doehlert apresenta-se no Apêndice B, Figura B1. A superfície de resposta resultante foi apresentada na Figura 20 B, na qual as regiões vermelhas corresponderam às coordenadas dos fatores que resultaram nos maiores valores do fator resposta. Os valores críticos de temperatura e concentração de β -CD foram, respectivamente, 11,4 °C e 9,4 mmol L⁻¹, determinados pelo modelo que melhor descreveu os dados para geração da superfície. Este foi explicado pela interação linear e quadrática dos efeitos principais avaliados utilizando a ANOVA de dupla classificação. A Equação 6 representa o modelo matemático no qual os dados foram descritos.

$$RF = -4,539 - 0,045T - 0,017T^2 + 1,564[\beta\text{-CD}] - 0,111[\beta\text{-CD}]^2 + 0,046T[\beta\text{-CD}] \quad (6)$$

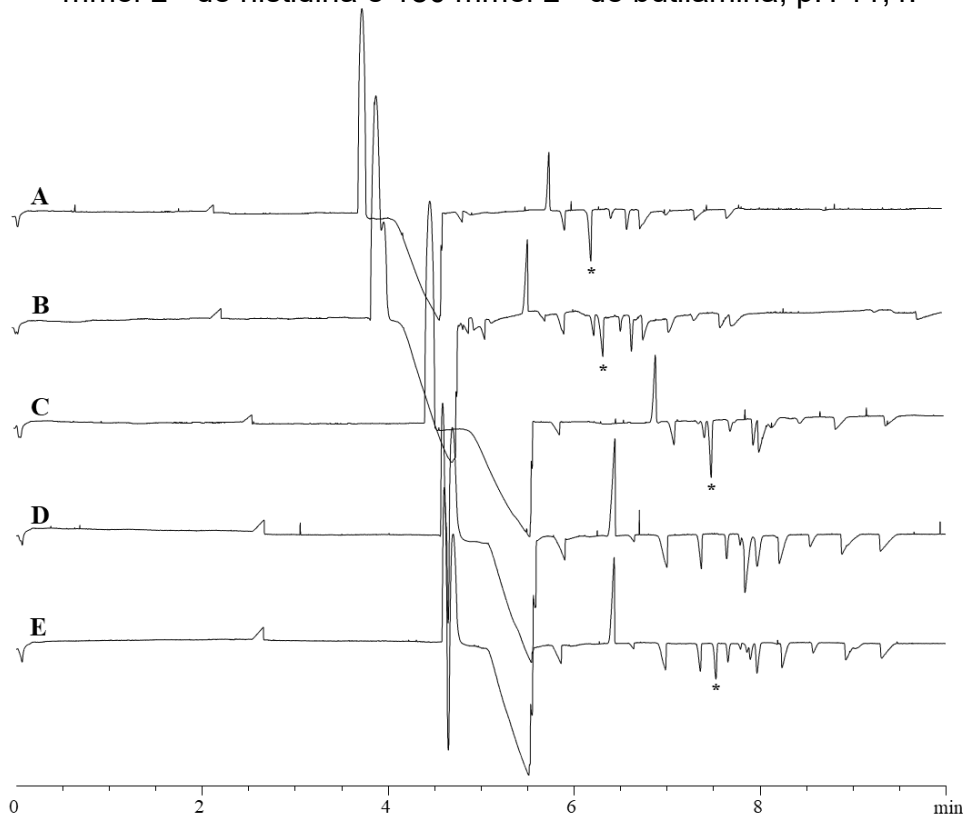
O modelo demonstrou ser preditivo, sem falta de ajuste significativa ($p = 0,112$) e com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,979. O teste de Shapiro-Wilk indicou normalidade os valores da variável dependente (valor- $p = 0,15$) (Shapiro e

Wilk, 1965). Embora a temperatura crítica tenha sido obtida a partir do modelo, optou-se por utilizar o valor de 12,5°C, para obter um melhor desempenho no tempo de estabilização da temperatura do instrumento, em tempo inferior a 10 minutos no início de uma sequência. Ainda, a temperatura de 12,5°C foi também um nível avaliado pelo planejamento Doehlert, localizado na mesma região de alto valor para o fator resposta. Complementarmente, a concentração de β -CD de 10 mmol L⁻¹ foi identificada graficamente e foi adotada como condição de compromisso.

Finalmente, o pH da amostra foi ajustado para 11,4 com BUT a adição de 0,1 mol L⁻¹, o que promoveu uma maior simetria e eficiência dos picos, aumentando a abundância de HYP aniônico previamente a aplicação da diferença de potencial. Como resultado do desenvolvimento do método, estão apresentados os eletroferogramas, na Figura 21 A sem adição de β -CD e redução da temperatura, que foram respectivamente demonstradas na Figura 21 B e C. Enquanto na Figura 21 D e E apresenta-se o resultado da separação com os aminoácidos interferentes e após a adição de HYP para melhor evidenciar sua detecção seletiva em soluções padrão.

Pelo comparativo entre os eletroferogramas verificou-se que a adição de β -CD, não causou modificações significativas na mobilidade do fluxo eletrosmótico (Figura 14 B), porém propiciou maior resolução e número de sinais do que quando somente a temperatura foi reduzida para 12,5°C (Figura 14 C). Em ambos os casos, houve aumento da resolução entre a HYP e os interferentes. Adicionalmente, a redução da temperatura agregou maior detectabilidade. A sinergia entre a temperatura e a β -CD, promoveram uma resolução ainda maior ($R_s = 3,2$). A análise contraeletrosmótica sob mobilidade do EOF reduzida ($+44 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), majoritariamente, devido a redução da temperatura, acarretou um maior tempo de residência dos íons no interior do capilar e, como conseqüente, propiciou maior contato com a β -CD e ampliou a diferença de mobilidade.

Figura 21 – Eletroferogramas comparativos da separação da *trans*-4-hidroxi-L-prolina (HYP) dos aminoácidos interferentes a 20°C (A); contendo β -ciclodextrina (β -CD) e na mesma temperatura (B); sem β -CD e a 12,5 °C (C); contendo β -CD e a 12,5°C para somente os aminoácidos (D) e após a adição de HYP (E). Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 μ m i.d. e 375 μ m o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L⁻¹ de histidina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina, pH 11,4.

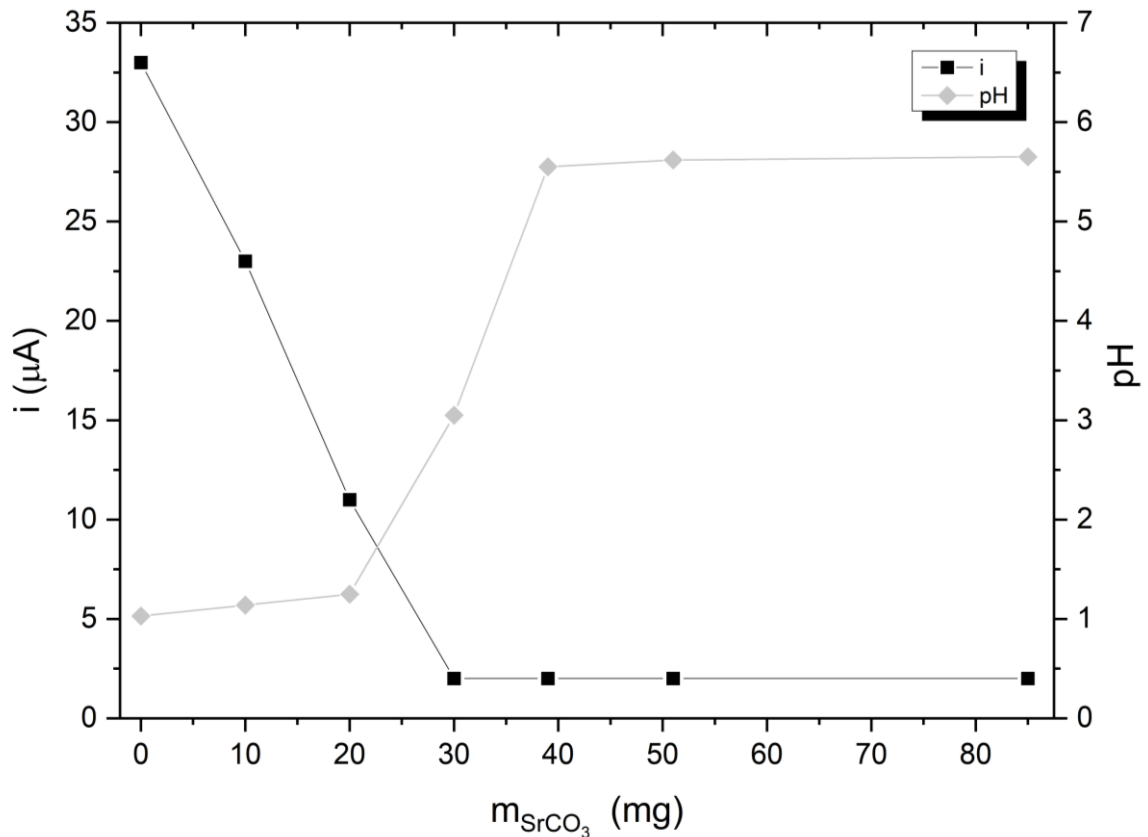


Fonte: o próprio autor.

5.4 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA: HIDRÓLISE SEGUIDA DE PRECIPITAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO COM SULFATO DE ESTRÔNCIO

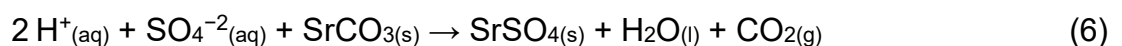
Mantendo a proporção entre a massa da amostra e o volume do ácido conforme o método original AOAC 990.26, o peso da amostra foi reduzido cuidadosamente, evitando comprometer a homogeneidade. Concentrações elevadas de hidrolisado com ácido sulfúrico tornaram a separação inviável, resultando em uma linha de base instável e alargamento dos picos. Ajustes na solução de hidrolisado foram feitos adicionando uma massa de SrCO₃. A Figura 22 demonstra a variação de pH e corrente elétrica (μ A) decorrente das sucessivas adições de massa de SrCO₃ a um hidrolisado de bebida em pó contendo colágeno.

Figura 22 – Sucessivas adições de sulfato de estrôncio (SrSO_3) e as alterações na corrente (i) e no pH do hidrolisado de pó para bebidas.



Fonte: o próprio autor.

O SrCO_3 foi utilizado devido às suas características básicas e solubilidade baixa em água, de modo que a sua adição não promovesse o aumento da força iônica. Sem a adição de SrCO_3 , o pH estava próximo de 1, com uma corrente elétrica máxima medida no sistema de CE. À medida que o SrCO_3 foi adicionado, o pH aumentou e a corrente elétrica diminuiu até atingir um valor mínimo de corrente e um pH de 5,5. A força iônica foi reduzida devido à conversão do sulfato em um sal insolúvel com estrôncio (SrSO_4 , $K_s = 3,2 \times 10^{-7}$), íons hidrônio convertidos em água e carbonato em gás carbônico (Skoog *et al.*, 2014). A reação do processo simultâneo de precipitação/neutralização é expressa na Equação 6:



Moléculas neutras são formadas como produto durante o processo de precipitação/neutralização, reduzindo conseqüentemente a força iônica, tornando as amostras aptas a interpretação no sistema de CE. A massa adequada de SrCO_3 foi

avaliada para diferentes amostras analisadas, e os valores selecionados foram 35 e 105 mg, para suplementos alimentares e produtos cárneos, respectivamente.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE COLÁGENO VIA TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA

Em primeiro lugar, foi constantemente avaliada a seletividade durante o desenvolvimento do método, considerando os aminoácidos como interferentes para a separação de HYP, em soluções padrão. Inclusive, otimizações foram realizadas tendo como principal objetivo assegurar este parâmetro. Ainda, a identidade do sinal de HYP nas amostras de hidrolisados foram confirmadas com base nos tempos de migração da amostra em relação aos das soluções padrão de misturas de aminoácidos adicionadas de HYP. Por fim, as concentrações de HYP em amostras de cada grupo, foram estatisticamente iguais à análise de LC-MS/MS.

Todos os valores e critérios para os parâmetros de validação na avaliação do desempenho do método foram apresentados na Tabela 3. Para avaliação do efeito da matriz, foram selecionadas amostras representativas de cada grupo, com base em critérios de extensão da matriz (Magnusson, 2014). A comparação das inclinações para as regressões das curvas externa e de adição, o teste F indicou variâncias equivalentes. Pelo teste t não houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$). As razões das inclinações ficaram entre 0,9 e 1,1, uma diferença inferior a 10% (Hoff et al., 2015). Em conjunto com o procedimento de precipitação e neutralização, a limpeza das amostras *online* em CE que, após o sinal de EOF, direcionou apenas ânions para a janela de detecção, possivelmente, atenuou o efeito da matriz. Ainda, a detecção indireta suprimiu os sinais cromóforos da amostra. Além disso, a temperatura e a concentração de β -CD forneceram mobilidade específica para HYP.

Os eletroferogramas da Figura 23 demonstram o sinal de HYP (9) em um tempo de migração específico, separado dos interferentes críticos. A ausência ou a baixa intensidade do sinal de HYP nos eletroferogramas de amostras brancas e de baixo nível (Figura 23 A3 e B3) corroboram com a premissa de seletividade.

Como mostrado na Figura 23 A e B1, os resultados dos eletroferogramas das curvas de calibração externa foram usados para avaliação da linearidade, uma vez que o efeito da matriz foi negligenciável para ambas as amostras representativas encontradas na Figura 23 A3 e B3. Na faixa de trabalho apresentada, a linearidade

das curvas externas foi atestada. Os coeficientes de determinação (R^2) estavam acima dos critérios de aceitação, cuja recomendação mínima é 0,99 (AOAC International, 2016, Magnusson, 2014). A falta de ajuste não foi significativa de acordo com o teste F, que retornou F_{calc} menor que F_{crit} para ambas as matrizes. Os resíduos da regressão linear foram aleatórios e não mostraram tendência. Além disso, eles eram normais e homocedásticos de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Levene ($\alpha = 0,05$), respectivamente (Shapiro and Wilk, 1965, Levene, 1960). As inclinações da regressão linear foram uma estimativa de sensibilidade, cujos valores eram maiores para o método de produtos cárneos. Os volumes de injeção foram cerca de duas vezes maiores para esse grupo de amostras. Por esse motivo, LOD e LOQ mais baixos também foram alcançados para produtos cárneos.

Figura 23 – Eletroferogramas do padrão aquoso 50 mg L^{-1} de trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) (A1, B1), inclusão dos aminoácidos (A2, B2), preparado para bebidas em pó E (A3), salsicha (B3), preparado para bebidas em pó A (A4), linguiça *bruhwürst* (B4). A mobilidade media do fluxo eletrosmótico foi de $44 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Legenda: 1 – L-prolina; 2 – CHES; 3 – L-triptofano; 4 – L-fenilalanina; 5 – L-leucina; 6 – L-isoleucina; 7 – MOPS; 8 – L-valina; 9 – HYP; 10 – L-metionina; 11 – L-alanina; 12 – L-glutamina; 13 – L-treonina; 14 – L-asparagina; 15 – L-serina.

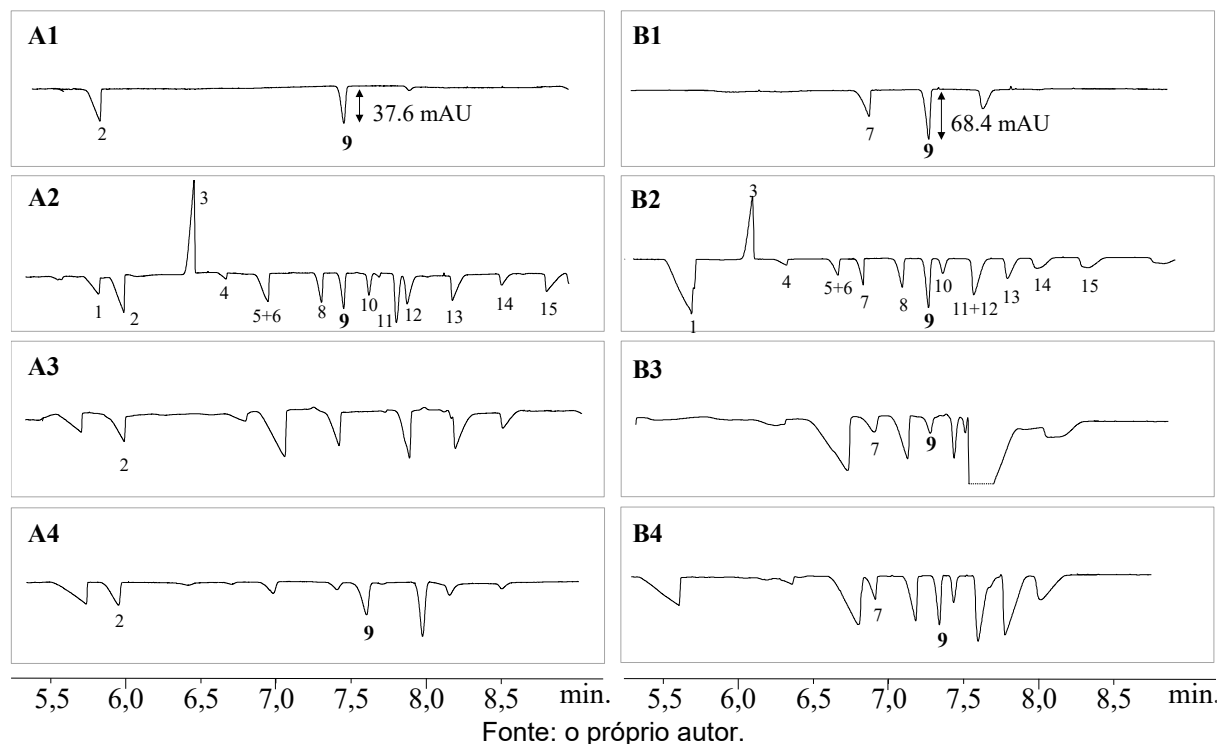


Tabela 3 – Performance analítica do método em termos de figuras de mérito.

Parâmetros de mérito	Amostras					
	Suplementos			Produtos cárneos		
Efeito de matriz						
F_{calc}^a	0,13			0,99		
t_{calc}^b	0,82			0,88		
Razão entre coeficientes angulares ^c	0,97			1,04		
Linearidade						
Faixa linear (mg L ⁻¹)	26,80 – 160,80			5,40 – 54,00		
Coeficiente angular (L mg ⁻¹)	0,009			0,021		
Intercepto (mg L ⁻¹)	0,017			-0,009		
Coeficiente de determinação (R ²)	0,998			0,999		
Falta de ajuste - F_{calc}^d	0,08			0,15		
Normalidade dos resíduos – Shapiro-Wilk (W e p-valor) ^e	0,96 e 0,62			0,97 e 0,84		
Homogeneidade dos resíduos – Levene (p-valor) ^f	0,74			0,87		
Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)						
LOD (HYP mg L ⁻¹)	2,07			1,48		
LOQ (HYP mg L ⁻¹)	6,26			4,70		
LOD (COL g/100g)	1,44			0,06		
LOQ (COL g/100g)	4,38			0,16		
Repetibilidade*	Níveis de concentração para HYP (mg L ⁻¹)					
	Min.	Med.	Máx.	Min.	Med.	Máx.
Área normalizada – CV (%)	2,36	3,10	3,46	4,39	3,76	3,58
Tempo de migração normalizado – CV (%)	1,03	0,19	0,75	0,16	0,20	0,16
Precisão intermediária*						
Área normalizada – CV (%)	6,21	6,79	3,37	6,87	4,06	3,73
Tempo de migração normalizado – CV (%)	0,66	0,34	0,48	0,38	0,37	0,22
Recuperação						
Adicionado (mg L ⁻¹)	26,80	107,20	160,80	5,40	21,60	54,00
Quantificado (mg L ⁻¹)	24,60	109,00	157,40	5,19	19,04	52,30
Recuperado (REC - %) ^g	91,70	101,70	97,90	96,17	88,18	96,86
Exatidão por comparação entre métodos			Preparado para bebida em pó A			Linguiça D (Brühwurst)
Método LC-MS/MS (Colgrave et al., 2008) – COL (g/100g)			86,28 ± 1,82			3,25 ± 0,18
Método proposto – COL (g/100g)			89,38 ± 3,20			2,87 ± 0,03
Teste t-pareado ^h			3,76			3,50

^a $F_{crit(2,2; 0,05)} = 19,00$, H_0 – variâncias equivalentes ($F_{calc} < F_{crit}$);

^b $t_{crit(4, 0,05)} = 2,78$ (bicaudal), H_0 – não houve diferença significativa entre médias se $t_{calc} < t_{crit}$;

^c Razão entre os slopes de curvas analíticas externa e de adição. Aceitação de 0,9 a 1,1 (Hoff et al., 2015).

^d $F_{crit(4,12; 0,05)} = 3,26$; $F_{calc} = \frac{\sum(y_m - y^{\wedge}_m)^2_{ajuste}}{\sum(y_i - y_m)^2_{erro}}$; H_0 – não houve falta de ajuste se $F_{calc} < F_{crit}$;

^e H_0 – não houve diferença significativa de dados normais se $W_{calc} > W_{crit}$; $W_{crit(17, 0,05)} = 0,89$;

^f H_0 – médias das curvas analíticas externas são consideradas iguais se: p-valor > α (0,05);

^g $REC(\%) = 100 \cdot \frac{quantificado}{adicionado}$;

^h $t_{crit(2, 0,05)} = 4,30$; H_0 – não houve diferença significativa se $t_{calc} < t_{crit}$;

* $CV = 100 \cdot \frac{s}{x}$, CV = coeficiente de variação, s = desvio padrão e x = média aritmética.

Os valores de CV de repetibilidade e precisão intermediária para suplementos e produtos cárneos, para o tempo de migração corrigido e, especialmente, para a razão de área, foram adequados, atendendo aos critérios de aceitação mais rigorosos ($\leq 6\%$) especificados para todos os níveis de concentração (Magnusson, 2014). A recuperação das amostras representativas estava de acordo com os critérios de níveis de concentração avaliados especificados para até 10 mg L^{-1} e até 100 mg L^{-1} , que são de 80-110% e 90-107%, respectivamente (AOAC International, 2016, Brasil, 2016). A precisão avaliada pela comparação com o método LC-MS/MS para a bebida em pó hidrolisada com sabor (pó para bebida A) e a linguiça E (*brühwurst*) retornaram concentrações de colágeno (Tabela 3) que foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste t pareado ($\alpha = 0,05$). Além disso, uma maior confiabilidade a partir do método comparativo LC-MS/MS assegurou a assertividade sobre a identidade do sinal de HYP no método proposto.

5.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E PRODUTOS CÁRNEOS

Com o método validado, este foi aplicado em amostras de suplementos hidrolisados e neutralizados, bem como amostras de produtos cárneos do comércio nacional e local. Para o cruzamento de informações sobre os resultados quantificados, os rótulos de cada amostra em termos da fonte principal de colágeno, localização e tipo de embalagem foram compilados no Quadro 1, localizado na seção 4.5 Os resultados das concentrações de colágeno para 11 amostras de suplementos e 10 amostras de produtos cárneos estão listados na Tabela 4.

O teor de proteína rotulada nas amostras de suplementos, cujos valores variaram de 13,3% a 91,7%. Com exceção do preparado para bebidas em pó E, cuja fonte proteica foi vegetal, todas as amostras apresentaram níveis acima do limite de quantificação (LOQ), como evidenciado nos eletroferogramas apresentados na Figura 24. O teor médio de colágeno quantificado variou de 15,0 a 91,3 g/100 g. Para estas, o colágeno foi a única fonte de proteína com base nas formulações de ingredientes rotulados das amostras. A discrepância em relação ao teor médio de colágeno entre o rotulado e o quantificado pelo método proposto, para cada uma das amostras de suplementos, foi comparada e expressa como um erro relativo. As discrepâncias variaram de -22,0% a 1,5%.

Tabela 4 – Teor de colágeno (COL) e trans-4-hidroxi-L-prolina (HYP) em amostras de suplementos alimentares e produtos cárneos determinados pelo método proposto.

Suplementos alimentares*	HYP (g/100 g) ^a	COL (g/100 g) ^{a,b}	Conteúdo proteico rotulado (g/100 g)	Erro relativo (%) ^c	Produtos cárneos ^d	HYP (g/100 g) ^a	COL (g/100 g) ^{a,b}
Preparado para bebidas em pó A	11,29 ± 0,48	90,34 ± 3,87	89,00	1,51	Linguiça A (calabresa)	0,21 ± 0,01	1,68 ± 0,08
Preparado para bebidas em pó B	8,58 ± 0,53	68,61 ± 4,20	71,79	-4,44	Linguiça B (calabresa)	0,17 ± 0,02	1,34 ± 0,02
Preparado para bebidas em pó C	9,90 ± 0,74	79,18 ± 5,94	85,56	-7,45	Linguiça C (calabresa)	0,28 ± 0,01	2,27 ± 0,08
Preparado para bebidas em pó D	8,52 ± 0,29	68,13 ± 2,32	73,33	-7,10	Linguiça D (paio)	0,18 ± 0,01	1,43 ± 0,04
Preparado para bebidas em pó E ^e	< LOD	< LOD	73,33	-	Linguiça E (<i>brühwurst</i>)	0,36 ± 0,01	2,87 ± 0,03
Capsula (óleo)	3,51 ± 0,18	28,09 ± 1,45	33,33	-15,74	Salsicha	0,41 ± 0,01	3,31 ± 0,03
Colágeno hidrolisado	10,70 ± 0,29	85,57 ± 2,34	91,67	-6,65	Fiambre	0,16 ± 0,01	1,25 ± 0,09
Gelatina hidrolisada	11,94 ± 0,73	91,35 ± 5,86	83,33	9,62	Mortadela A	0,13 ± 0,01	1,06 ± 0,02
Pilula A	1,88 ± 0,04	15,01 ± 0,29	13,33	12,58	Mortadela B	0,29 ± 0,01	2,33 ± 0,04
Pilula B	10,45 ± 0,53	83,61 ± 4,27	81,82	2,19	Pate	0,05 ± 0,01	0,43 ± 0,05
Pilula C	7,80 ± 0,89	62,38 ± 7,11	80,00	-22,02			

* Letras representam diferentes amostras de uma mesma categoria;

^a Conteúdo expresso em base úmida;

^b Conteúdo de colágeno calculado ao multiplicar a concentração de HYP (g/100g) por oito;

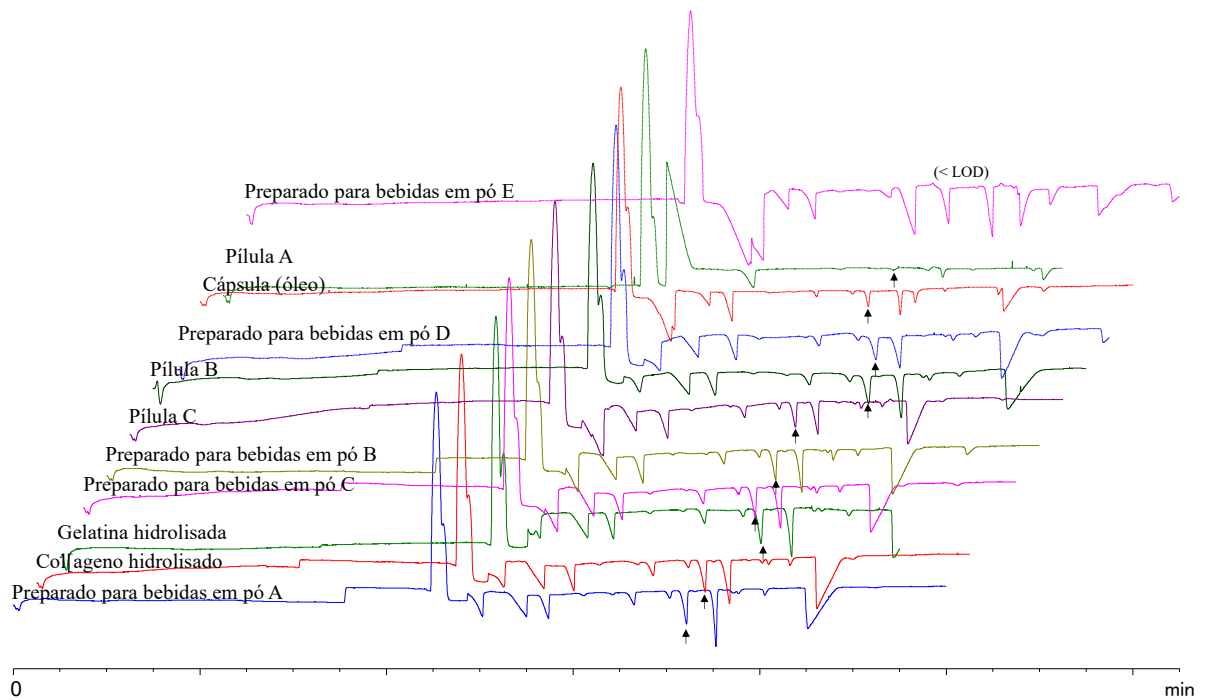
^c Sinais negativos e positivos, respectivamente, indica se os níveis de COL são menores ou maiores que os valores proteicos tabelados;

^d Amostras cozidas ou fervidas;

^e Inferior a concentração respectiva ao limite de detecção (< LOD).

Fonte: o próprio autor.

Figura 24 – Eletroferogramas para as amostras de suplementos alimentares avaliadas pelo método proposto. As setas indicam o tempo de migração para a trans-4-hidroxi-L-prolina. Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 μm i.d. e 375 μm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L^{-1} de histidina e 180 mmol L^{-1} de butilamina e 10 mmol L^{-1} de β -ciclodextrina no pH 11,4.



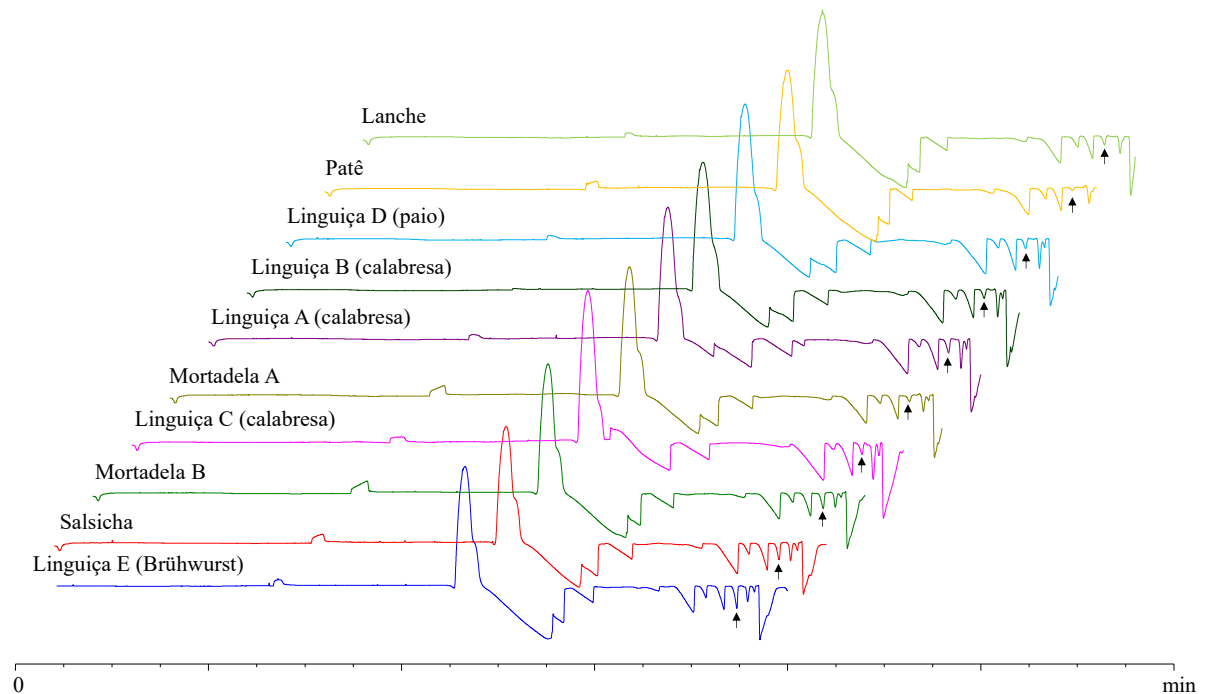
Fonte: o próprio autor.

No entanto, apenas o comprimido C estava em desacordo, uma vez que a ANVISA admite uma variação de 20% em relação ao valor nutricional de proteína rotulada (Brasil, 2003). A gelatina hidrolisada, o colágeno hidrolisado e o preparado para bebidas em pó A foram as matrizes mais abundantes e com alta correlação com os dados rotulados.

O teor rotulado para proteína total nas amostras de produtos cárneos variou de 9,0% a 21,5%. Os eletroferogramas de uma replicata das amostras de produtos cárneos podem ser encontrados na Figura 25. Notou-se uma maior complexidade da amostra e um perfil homogêneo de sinais para os produtos cárneos, em relação aos suplementos. Os valores médios de colágeno quantificado variaram de 0,43 a 3,3 g/100 g. Todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de colágeno em conformidade com cada categoria de produto cárneo, mediante as tolerâncias regulamentadas para uso de CMS (Brasil, 2000a, c; b). Os níveis de colágeno em patês de frango foram os mais baixos devido à ausência de ingredientes de tecido

conjuntivo, uma vez que o uso de CMS para esse tipo de produto não foi estabelecido (Brasil, 2000c). Diferente do patê, a CMS foi o principal ingrediente para as outras amostras. A abundância de colágeno foi maior em salsicha e linguiça E (*bruwurst*), devido a uma maior tolerância de CMS legislada (Brasil, 2000a).

Figura 25 – Eletroferogramas para amostras de produtos cárneos. As setas indicam o tempo de migração para a trans-4-hidroxi-L-prolina. Condições de análise: capilar de sílica fundida de comprimento total de 64,5 cm e efetivo de 56 cm (75 μm i.d. e 375 μm o.d.). Voltagem de 30 kV, polaridade positiva na extremidade de injeção. Injeção de 50 mbar por 10 segundos. Detecção em 220 nm. Eletrólito: 25 mmol L⁻¹ de histidina e 180 mmol L⁻¹ de butilamina e 10 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina no pH 11,4.



Fonte: o próprio autor.

5.7 VERDOR DO MÉTODO PELA ECO-ESCALA E SOFTWARE AGREE E COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO COM A LITERATURA

O desempenho do verdor do método indireto proposto foi avaliado pela eco-escala. As penalidades específicas de pontuação são apresentadas na Tabela 5. Considerando um ponto de partida de 100%, a premissa de verdor do método analítico e a dedução de pontos de penalização para riscos de reagentes, riscos ocupacionais,

quantidade de resíduos produzidos e energia necessária para a análise de cada amostra. O método obteve um valor de eco-escala de 86 (100 - pontos de penalização), o que o coloca na categoria acima de 75 pontos. Como resultado, ele é considerado um exemplo de excelente química verde (Gałuszka *et al.*, 2012; Moema *et al.*, 2023).

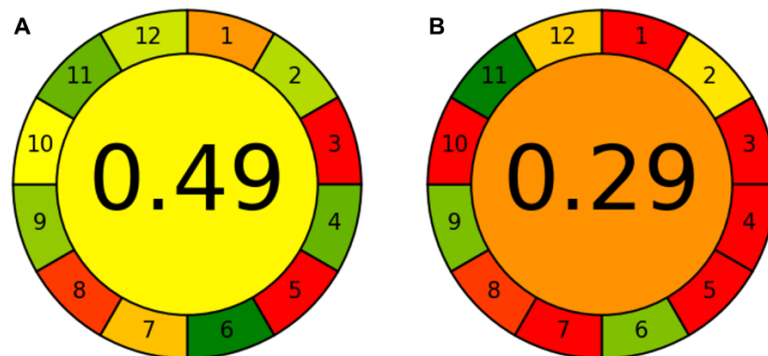
Tabela 5 – Descrição do procedimento de determinação do verdor do método pela utilização da eco escala.

ECO ESCALA				
REAGENTES				
Substâncias	Quantidade (g ou mL)	Pictogramas de risco	Risco	Pontos de penalidade
L-histidina	0,01	0	0	0
Butilamina	0,10	3	2 (perigo)	6
β-ciclodextrina	0,11	0	0	0
Trans-4-hidroxi-L-prolina	0,01	0	0	0
Ácido sulfúrico	1,5 ou 7,5	1	2 (perigo)	2
Carbonato de estrôncio	0,03 ou 0,10	0	0	0
				sub-total 8
INSTRUMENTAL				
Instrumento			Energia (kWh por amostra)	Pontos de penalidade
Estufa de secagem e esterilização			1,1	1
Centrífuga			< 0,1	0
Eletroforese capilar			< 0,1	0
				sub-total 1
RISCO OCUPACIONAL				
Substância			Risco	Pontos de penalidade
Butilamina			3	3
Dióxido de carbono			0	0
				sub-total 3
RESÍDUO				
Quantidade (g)			Risco	Pontos de penalidade
> 10 (passivação por simultânea neutralização e precipitação)			2	2
				Pontos de penalidade totais
				14
				Valor da eco escala
				86

Fonte: o próprio autor.

Pelo software AGREE foi obtido o arco da Figura 26 para o método proposto (A) e para o método oficial AOAC 990.26 (B), a fim de simbolizar suas pontuações quanto ao verdor analítico e compará-las.

Figura 26 – Arco em seções que representam os 12 princípios da química analítica verde para o método proposto (A) e o método oficial AOAC 990.26 (B). As cores verde, amarelo, vermelho e suas nuances representam, respectivamente, do excelente ao inadequado grau de verdor.



Fonte: gerado pelo software AGREE (Pena-Pereira, Wojnowski e Tobiszewski, 2020).

As respostas sobre o método proposto para os 12 critérios do software AGREE foram: A análise não foi direta, requisitou preparo de amostras, em reduzido número de etapas (1). A massa de amostra foi de 1,00 g (2). A instrumentação esteve *offline* (3) com relação às outras etapas de hidrólise, filtração, neutralização seguida da precipitação do principal interferente e centrifugação (4). O processo não foi automatizado ou miniaturizado (5). O derivatizante foi evitado (6). Foram poucos microlitros do BGEs por amostra analisada. Porém 11 mL foram produzidos como resíduo por amostra, advindos de 10 mL do hidrolisado de produto cárneo, 0,1 mg de sulfato de estrôncio gerado e 0,7 mL do tubo *vial*. A passivação foi feita por neutralização (7). Apenas a HYP foi analisada e a frequência analítica determinada em número de amostras por hora. Considerando um CE com 49 posições, pôde-se alocar curvas analíticas ($n = 15$), o *vial* para descarte, três trocas dos pares de BGE e dois para a limpeza do capilar e 25 poços replicatas de amostras. Resultando em 7,7 horas de análise instrumental. Cada análise levaria 11,5 minutos, considerando 1,5 minuto para o preenchimento do capilar e troca de *vials* automática, tempo de corrida de 8,5 minutos e 75 segundos de condicionamento do capilar entre corridas. Foram computadas 16 horas de hidrólise e três horas para o preparo de todas as amostras.

Por fim, seriam necessárias 27,7 horas, que resultariam em cerca de 1,5 análises por hora (8). A instrumentação de maior consumo foi a estufa de secagem com 0,22 kWh por análise (9). O analito, e a histidina são derivados de organismos vivos e a β -CD de fontes renováveis (10). A butilamina foi o reagente tóxico e inflamável (11) e o ácido sulfúrico o corrosivo (12).

A pontuação do método proposto totalizou 0,49, cujo desempenho geral foi aceitável. Para composição da pontuação foram considerados: inadequados os princípios 3, 5 e 8; medianos 1, 7 e 10; e de bom a excelente em 2, 4, 6, 9, 11 e 12. As maiores penalidades para o método proposto são em virtude da falta de automatização única por todo o método. Comparativamente, notam-se 7 princípios inaceitáveis para o método clássico, que estão relacionados a maior quantidade de amostra, consumo de reagentes, número elevado de etapas e produção de resíduos.

Diante de outros métodos apresentados na Tabela 1, localizada na seção 2.3.1 da revisão da literatura, que compilou os métodos mais representativos da literatura para análise rotineira de colágeno em amostras de alimentos, o desempenho do método proposto foi comparado em termos de aplicabilidade, tempo de separação, precisão, exatidão, LOD e LOQ. O tempo de separação variou entre 5,0 e 50,0 minutos, ou seja, o método proposto (8,5 minutos) aproxima-se dos valores inferiores, que podem ser considerados os que proporcionariam maior frequência analítica, considerando apenas a análise. O escopo do método proposto foi amplo e competitivo em termos de representatividade, diante da realidade nacional. A etapa clássica de hidrólise ácida foi a mais praticada na preparação da amostra. Em termos de desempenho do método proposto, os valores encontrados para a exatidão foram equivalentes aos métodos (Colgrave et al., 2008, Messia et al., 2008, Yuswan et al., 2021). Embora, seja um método indireto, este alcançou a faixa de precisão mais estreita em comparação com outros métodos (Colgrave et al., 2008, Mazorra-Manzano et al., 2012, Messia et al., 2008, Yuswan et al., 2021). Exceto pelo método de LC-MS/MS, cujos limites analíticos eram mais baixos, os valores do método proposto foram equivalentes à literatura e adequados para as amostras analisadas.

6 CONCLUSÃO

Duas propostas foram abordadas no presente trabalho e, primeiramente, foi concluída a tentativa de determinação do teor de colágeno por monitoramento direto da P2C. Embora a reação de oxidação de HYP com cloramina-T não tenha retornado evidências para a formação de P2C, o desenvolvimento do método de separação foi bem-sucedido. O método de CZE apresentou-se de fácil execução, com reagentes acessíveis e alta frequência com tempo de análise sub-minuto. Ainda, informações como o pK_a e sua mobilidade efetiva em função do pH foram caracterizados pelo presente trabalho. O método poderia ter utilidade em reações *in-vivo* e enzimáticas, tendo em vista que a literatura dá suporte sobre a sua ocorrência pela ação da D-amino oxidase. Ainda, os resultados da espectrometria de massas para os meios reacionais podem ser indicativos de outras substâncias passíveis de monitoramento neste processo.

Em proposição para determinação do teor de colágeno pela quantificação da HYP, no contexto da modelagem *in silico*, planejamento multivariado de experimentos e metodologia de superfície de resposta foram úteis para selecionar um BGE adequado e ajustar os parâmetros do instrumento, destacando a combinação de temperatura e concentração de β -CD e sua influência na seletividade do método. Antes da análise por CE, o ajuste da força iônica dos hidrolisados da amostra e a sua limpeza foram alcançadas com a neutralização seguida de precipitação com $SrCO_3$ em etapa única. O teor total de colágeno foi determinado com sucesso em amostras de suplementos alimentares e produtos cárneos sem a etapa de derivatização em um sistema CE convencional. O procedimento está em conformidade com o veredor para a eco-escala, mas a metodologia AGREE evidenciou pontos de melhora, especialmente no quesito de geração de resíduos do preparo de amostra, automação do processo como um todo e miniaturização, estes últimos considerados inviáveis para a proposição.

A abordagem inovadora indireta permitiu a separação de HYP com detectabilidade equivalente em comparação com métodos espectrofotométricos auxiliados por derivatização. A validação do método seguiu as diretrizes internacionais e os níveis de colágeno em produtos cárneos estavam em conformidade com os regulamentos. Além disso, este método também produziu resultados confiáveis para amostras de suplementos alimentares. O tempo de hidrólise foi um dos limitantes para

frequência analítica, porém esta poderia ser aprimorada, futuramente, com a utilização do micro-ondas. Ainda, em trabalho de conclusão de curso da aluna Rafaela da Silva Barbosa, foi realizada a ampliação do escopo deste método ao realizar a identificação da origem de aglutinantes utilizados na preparação de telas de obras de arte pela determinação dos aminoácidos L-glicina, L-prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina, L-serina e L-tirosina. Tal fato demonstra a possibilidade de outras aplicações para o método proposto. Por isto, o potencial do método para a separação e validação de outros aminoácidos e poderia ser utilizado em aplicações das mais diversas matrizes.

REFERÊNCIAS

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

AOAC INTERNATIONAL. Stakeholder Panel on Dietary Supplements. *Em: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 2023.

ARNETH, W.; HAMM, R. Über die Hydroxyprolinbestimmung zur Ermittlung des kollagenen Bindegewebes in Fleisch und Fleischwaren. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 144, n. 5, 1970.

BERNARDO-BERMEJO, S. *et al.* Stereoselective separation of 4-hydroxyproline by electrokinetic chromatography. **Microchemical Journal**, v. 185, p. 108279, 1 fev. 2023.

BIELAJEW, B. J.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. **Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage. Nature Reviews Materials**, 2020.

BIELAJEW, B. J.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. Methodology to Quantify Collagen Subtypes and Crosslinks: Application in Minipig Cartilages. **Cartilage**, v. 13, n. 2, 2021.

BOCCHI, V. *et al.* On pyrrole oxidation with hydrogen peroxide. **Tetrahedron**, v. 26, n. 17, p. 4073–4082, 1 jan. 1970.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 4, DE 31 DE JULHO DE 2000. **Diário Oficial da União**, 2000a.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 20, DE 31 DE JULHO DE 2000. **Diário Oficial da União**, 2000b.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 21, DE 31 DE JULHO DE 2000. **Diário Oficial da União**, 2000c.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n.º 360, de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, v. 2003, 2003.

BRASIL. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2016.

BRASIL. RIISPOA DECRETO N° 9.013. **Diário Oficial da União**, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa - IN Nº 28, de 26 de Julho de 2018. **Diário Oficial da União (DOU) nº144**, n. 1, 2018.

BRASIL. IN Nº 76, DE 5 DE NOVEMBRO DE 2020. **Diário Oficial da União**, v. 215, 11 nov. 2020.

BRASIL. PORTARIA Nº 384, DE 25 DE AGOSTO DE 2021. **Diário Oficial da União**, v. 163, n. 1, p. 17, 27 ago. 2021.

BRASIL. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022a.

BRASIL. **Perguntas & Respostas - Suplementos Alimentares**. Brasília, 2018.

BRASIL. IN Nº 211, DE 1º DE MARÇO DE 2023. **Diário Oficial da União**, 8 maio 2023.

CEDILLO-FLORES, O. E. *et al.* Effect of the pH on the thermodynamic stability of inclusion complexes of thymol and carvacrol in β -cyclodextrin in water. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 2022.

CHU, Q.; EVANS, B. T.; ZEECE, M. G. Quantitative separation of 4-hydroxyproline from skeletal muscle collagen by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 692, n. 2, 1997.

COLGRAVE, M. L.; ALLINGHAM, P. G.; JONES, A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1212, n. 1, p. 150–153, 2008.

COSTA, A. C. O. *et al.* Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 1, p. 123–127, 2008.

DENG, G. *et al.* Authentication of chicken-derived components in collagen-containing foods using natural macromolecular marker fragments by LC-MS method. **Polymer Testing**, v. 120, 2023.

DONG, Y. *et al.* Rapid and sensitive determination of hydroxyproline in dairy products using micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1233, p. 156–160, 2012.

DURAIRAJ, S.; SIDHUREDDY, B.; CHEN, A. Sensitive Electrochemical Analysis of Hydroxyproline in Achilles Tendon Collagen and Human Urine. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 16, 2020.

EFSA. Scientific Opinion on the public health risks related to mechanically separated meat (MSM) derived from poultry and swine. **EFSA Journal**, v. 11, n. 3, p. 78, 2013.

FEINER, G. **Meat products handbook: Practical science and technology**. 1. ed. Inglaterra: Woodhead Publishing, 2006.

FUGUET, E. *et al.* Critical evaluation of buffering solutions for pKa determination by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 29, n. 13, 2008.

GAIDAMAUSKAS, E. *et al.* Deprotonation of β -cyclodextrin in alkaline solutions. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 2, p. 250–254, 26 jan. 2009.

GAŁUSZKA, A. *et al.* Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 1 out. 2013.

GAS, B. *et al.* PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. **LC-GC Europe**, v. 18, p. 282–288, 1 maio 2005.

GAŠ, B. PeakMaster and Simul – Software tools for mastering electrophoresis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 165, p. 117134, 1 ago. 2023.

GRAND VIEW RESEARCH. **Collagen Market Size, Share, Trends & Growth Report, 2030**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/collagen-market#>>. Acesso em: 29 set. 2023.

GUZMAN, N. A. *et al.* A quantitative assay for the determination of proline and hydroxyproline by capillary electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n. 6–7, 1992.

HANCU, G. *et al.* Application of experimental design methodologies in the enantioseparation of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: A review. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 1–40, 2021.

HAO, L. *et al.* Effects of type II collagen hydrolysates on osteoarthritis through the NF- κ B, Wnt/ β -catenin and MAPK pathways. **Food & function**, 2022.

HEACOCK, A. M.; ADAMS, E. Formation and excretion of pyrrole 2 carboxylate in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 4, 1974.

HEXSEL, D. *et al.* Oral supplementation with specific bioactive collagen peptides improves nail growth and reduces symptoms of brittle nails. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 16, n. 4, p. 520–526, dez. 2017.

HIROKAWA, T. *et al.* Table of isotachophoretic indices : I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range ph 3–10. **Journal of Chromatography A**, v. 271, n. 2, p. D1–D106, 1 jan. 1983.

HIROKAWA, T. *et al.* Simulated quantitative and qualitative isotachophoretic indices of 73 amino acids and peptides in the pH range 6.4-10. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 2, 1993.

HOFF, R. B. *et al.* Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 2015.

HU, S.; HE, W.; WU, G. Hydroxyproline in animal metabolism, nutrition, and cell signaling. **Amino Acids** Springer, 2022.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5ª ed., São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISHAQ, S. *et al.* AOAC SMPR(®) 2016.005 - Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Quantitation of Collagen. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, 2016.

JAMALL, I. S.; FINELLI, V. N.; QUE HEE, S. S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 1, 1981.

JAMES, C.; PURNELL, G.; JAMES, S. J. Description of the Processes used in the UK to Manufacture MSM and Former DSM Meat Products from Poultry and Pork and an Initial Assessment of Microbiological Risk. 2013.

Jl, H. *et al.* Sensitive determination of l-hydroxyproline in dairy products by capillary electrophoresis with in-capillary optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection. **Analytical Methods**, v. 10, n. 19, 2018.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. A. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, 1981.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. A. **Capillary zone electrophoresis**. **Science**, 1983.

KAY, L. E. Laboratory technology and biological knowledge: the Tiselius electrophoresis apparatus, 1930-1945. **History and philosophy of the life sciences**, v. 10, n. 1, 1988.

KITAGAWA, F.; OTSUKA, K. Recent progress in capillary electrophoretic analysis of amino acid enantiomers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2011.

KNOX, J. H.; MCCORMACK, K. A. Temperature effects in capillary electrophoresis. 1: Internal capillary temperature and effect upon performance. **Chromatographia**, v. 38, n. 3–4, 1994.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, n. 1, 1990.

KUNDU, M.; SAHA, S.; ROY, M. N. Evidences for complexations of β -cyclodextrin with some amino acids by ^1H NMR, surface tension, volumetric investigations and XRD. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, 2017.

KUSEBAUCH, U. *et al.* Photocontrolled folding and unfolding of a collagen triple helix. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 42, 2006.

LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry Lehninger**. 6^a ed. Nova York: W. H. Freeman, 2009.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. **Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling**, v. 69, n. 346, 1960.

LIN, Y.-K.; KUAN, C.-Y. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1271–1277, 2010.

LUONG, J. H. T.; NGUYEN, A. L. Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1–2, 1997.

MAGNUSSON, B. **Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. 2^a ed., 2004

MALÝ, M. *et al.* Determination of thermodynamic acidity constants and limiting ionic mobilities of weak electrolytes by capillary electrophoresis using a new free software AnglerFish. **Electrophoresis**, v. 41, n. 7–8, 2020.

MANI, U. V.; RADHAKRISHNAN, A. N. The oxidation of hydroxyproline by chloramine T: evidence discounting pyrrole 2 carboxylate as an intermediate in the reaction. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 13, n. 2, 1976.

MARCONE, G. L. *et al.* D-amino acids in foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, 2020.

MARKETS, M. A. **Collagen Market by Product Type, Source, Application, Form and Region - Global Forecast to 2026**. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/collagen-market-220005202.html>>. Acesso em: 6 out. 2023.

MAZORRA-MANZANO, M. A. *et al.* A Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Hydroxyproline as a Collagen Content Index in Meat Products. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, 2012.

MERCK. **Material Safety Data Sheet: L-Hidroxirolina**. Disponível em: <<https://www.merckmillipore.com/>>. Acesso em: 6 out. 2023.

MESSIA, M. C. *et al.* Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC–PAD analysis of 4-hydroxyproline. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 401–409, 2008.

MOEMA, D. *et al.* Hollow fiber liquid phase microextraction of fluoroquinolones in chicken livers followed by high pressure liquid chromatography: Greenness assessment using National Environmental Methods Index Label (NEMI), green analytical procedure index (GAPI), Analytical GREENness metric (AGREE), and Eco Scale. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, p. 105131, 1 abr. 2023.

MONAGO-MARAÑA, O. *et al.* Raman, near-infrared and fluorescence spectroscopy for determination of collagen content in ground meat and poultry by-products. **LWT**, v. 140, 2021.

MUNDLE, S. O. C.; KLUGER, R. Decarboxylation via addition of water to a carboxyl group: Acid catalysis of pyrrole-2-carboxylic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, 2009.

NOTARIO, R. *et al.* Dramatic medium effects on reactivity. The ionization sites of pyrrole and indole carboxylic acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 50, 1998.

NOWAK, P. M.; WIETECHKA-POSŁUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, p. 116223, 1 maio 2021.

OLIVEIRA NEVES, L. N. DE; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Quantification of lactose and lactulose in hydrolysed-lactose UHT milk using capillary zone electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 106, 2020.

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

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **CHAPTER 2: METHODS OF FOOD ANALYSIS**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e03.htm>>.

ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, 2014.

PALMBLAD, M.; ECK, N. J. VAN; BERGQUIST, J. **Capillary electrophoresis - A bibliometric analysis** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2023.

PENA-PEREIRA, F. *et al.* A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, 1 ago. 2022.

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

PEREIRA, A. G. T. *et al.* Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. **Meat Science**, v. 89, n. 4, p. 519–525, 2011.

PÉREZ-MÍGUEZ, R.; MARINA, M. L.; CASTRO-PUYANA, M. Enantiomeric separation of non-protein amino acids by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1467, 2016.

PETERKOFISKY, B.; PROCKOP, D. J. A method for the simultaneous measurement of the radioactivity of proline-C14 and hydroxyproline-C14 in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 5, 1962.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204–209, 1 maio 2018.

PROCKOP, D. J.; UDENFRIEND, S.; LINDSTEDT, S. A simple technique for measuring the specific activity of labeled hydroxyproline in biological materials. **The Journal of biological chemistry**, v. 236, 1961.

RADHAKRISHNAN, A. N.; MEISTER, A. Conversion of hydroxyproline to pyrrole-2-carboxylic acid. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, 1957.

RANASINGHE, M.; QUIRINO, J. P. Can we replace liquid chromatography with the greener capillary electrophoresis? **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 31, p. 100515, 1 out. 2021.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, 2022.

SCHEPDAEL, A. VAN. Capillary electrophoresis as a simple and low-cost analytical tool for use in money-constrained situations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 160, p. 116992, 1 mar. 2023.

SENTANDREU, M. Á.; SENTANDREU, E. Authenticity of meat products: Tools against fraud. **Food Research International**, v. 60, p. 19–29, 2014.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Nutrient composition of mechanically separated and surimi-like seal meat. **Food Chemistry**, 1993.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3–4, 1965.

SHINTANI, H.; POLONSKY, J. **Handbook of Capillary Electrophoresis Applications**. 1^a ed. Nova York: Chapman & Hall, 1997.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929–958, 2009.

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

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentals of analytical chemistry**. 9^a ed. Belmont: Brooks/Cole, 2014.

SNEYDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. Factorial Experiments. *Statistical Methods*. 1989.

SZENTE, L.; SZEMÁN, J. Cyclodextrins in analytical chemistry: Host-guest type molecular recognition. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 17, 2013.

TAN, Y.; GHANDI, K. Kinetics and mechanism of pyrrole chemical polymerization. **Synthetic Metals**, v. 175, 2013.

TARNUTZER, K. *et al.* Collagen constitutes about twelve percent in females and seventeen percent in males of the total protein in mice. **bioRxiv**, 2022.

TAVARES, M. F. M.; MCGUFFIN, V. L. Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 686, n. 1, 1994.

TOLDRÁ, F. **Lawrie's Meat Science**. 8^a ed. Reino Unido: Woodhead Publishing, 2017.

VALCARCEL, J. *et al.* Production and physicochemical characterization of gelatin and collagen hydrolysates from turbot skin waste generated by aquaculture activities. **Marine Drugs**, v. 19, n. 9, 2021.

VALLEJO-CORDOBA, B. *et al.* Caillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 826–836, 2005.

VÁZQUEZ-ORTÍZ, F. A.; MORÓN-FUENMAYOR, O. E.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, N. F. Hydroxyproline Measurement by HPLC: Improved Method of Total Collagen Determination in Meat Samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 17, p. 2771–2780, 1 jan. 2004.

VIEIRA, V. D. *et al.* The novel Outer Plug Standardization (OPS) calibration strategy applied in a new method for the high-throughput determination of Cl⁻, NO₃⁻ and SO₄⁻² in rainwater samples. **Talanta**, v. 235, 2021.

VITALI, L.; FÁVERE, V. T.; MICKE, G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, 2011.

VLEUGELS, L. F. W. *et al.* Determination of the 'apparent pKa' of selected food hydrocolloids using ortho-toluidine blue. **Food Hydrocolloids**, v. 81, 2018.

WANG, J. *et al.* The biological effect of recombinant humanized collagen on damaged skin induced by UV-photoaging: An in vivo study. **Bioactive Materials**, v. 11, 2022.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 7, 1996.

WOŹNIAKIEWICZ, M. *et al.* Separation of 20 coumarin derivatives using the capillary electrophoresis method optimized by a series of Doehlert experimental designs. **Talanta**, v. 167, 2017.

WU, Z. *et al.* Metabolism, nutrition, and redox signaling of hydroxyproline. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 30, n. 4, 2019.

YUSWAN, M. H. *et al.* Hydroxyproline determination for initial detection of halal-critical food ingredients (gelatin and collagen). **Food Chemistry**, v. 337, p. 127762, 2021.

ZABOUB, A. *et al.* A combined DFT and experimental study of proline/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Liquids**, v. 216, 2016.

ZHANG, X.; GENG, Z.; WANG, Y. Density functional theory study of the mechanism of the acid-catalyzed decarboxylation of pyrrole-2-carboxylic acid and mesitoic acid. **Science China Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 762–768, 2011.

ZHOU, J.; TANG, W.; NG, S. C. Native β -cyclodextrins and their neutral derivatives for capillary electrophoresis. *Em: Modified Cyclodextrins for Chiral Separation*. 1^a ed. Heidelberg: Springer Berlin, 2013. v. 9783642376481.

APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE DO ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO EM FUNÇÃO DO PH

Em triplicata, o capilar foi preenchido por cada um dos BGEs descritos na Tabela A1. Foi introduzido um plugue contendo uma acetona 0,2% (marcador neutro, N1) e P2C 50 mg L⁻¹. Foram transferidos a 50 mbar por 5 segundos (t_{inj}) para a zona termostaticada e aplicada tensão (V_{prog}). Esta foi de 20 e, 25 kV apenas para o pH 2,0, por um tempo (t_{migr}) que variou de 25 a 85 segundos, do pH maior para o menor. O segundo plugue contendo apenas o marcador neutro (N2) foi introduzido e o conteúdo empurrado (100 mbar). Os eletroferogramas estão apresentados na Figura A1.

Tabela A1 - Soluções-tampão elaboradas para determinação da mobilidade e pK_a do ácido pirrol-2-carboxílico em cada condição de pH.

BGEs	Conc. (mmol L ⁻¹)	Força Iônica (mmol L ⁻¹)	pH teórico	pH _{exp.}	μ_{act} (10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Ácido fosfórico	15,3	20,7	2,4	2,0	0,0
Dihidrogenofosfato de sódio	16,0				
HIBA	53,5	22,9	3,8	3,6	-12,1
TRIS	22,6				
Ácido acético	40,0	20,7	4,7	4,5	-27,29
TRIS	20,7				
MES	65,9	21,2	5,7	5,8	-35,0
TRIS	21,3				
MES	25,6	20,4	6,6	6,8	-36,2
TRIS	21,0				
HIBA	23,5	23,5	7,2	7,3	-37,1
TRIS	26,3				
HIBA	21,9	21,9	8,5	8,5	-37,7
TRIS	70,7				

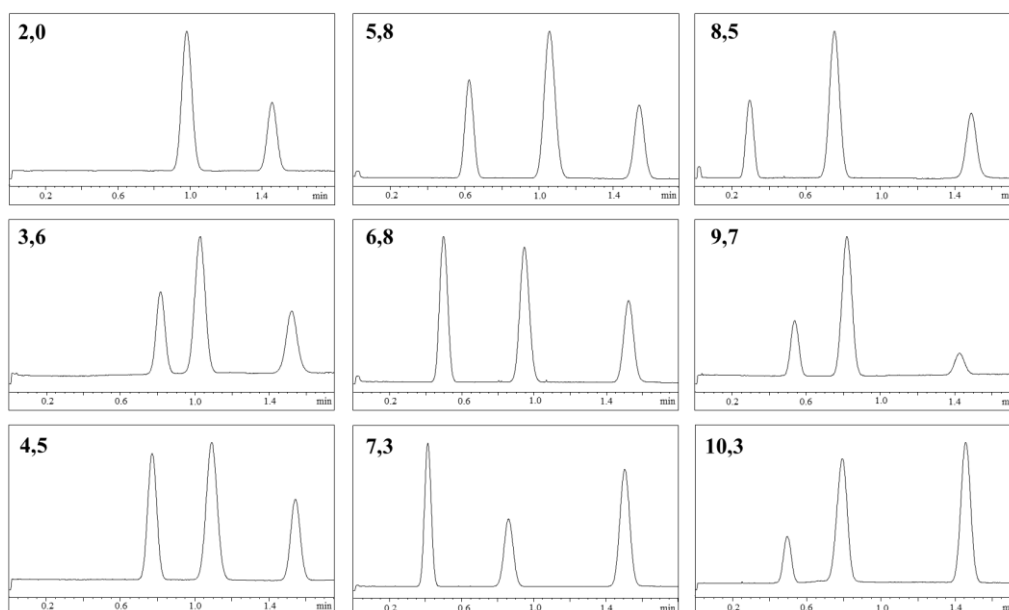
Fonte: o próprio autor.

Os eletroferogramas da Figura A1 foram registrados em 255 nm e os valores dos parâmetros utilizados no método, e os observados diretamente nos experimentos foram utilizados para o cálculo da mobilidade do P2C utilizando a Equação A1 abaixo:

$$\mu_{act, P2C^-} = \frac{(t_{P2C^-} - t_{N1})L_d}{t_{N2} + \left(\frac{t_{inj}}{2}\right) - t_d} V_{prog} (t_{migr} - (t_{ramp-up}/2) - (t_{ramp-down}/2)) \quad (A1)$$

Os termos supracitados foram substituídos pelos valores de cada condição de pH avaliado: para o tempo de migração do P2C (t_{P2C}), do primeiro (t_{N1}) e segundo marcador (t_{N2}), o atraso entre o final da aplicação da pressão e o início (t_d) e para a rampa atingir a voltagem ($t_{ramp-up}$) e retornar ($t_{ramp-down}$), todos na unidade de segundos.

Figura A1 - Eletroferogramas originados pelo método de Williams & Vigh (1996) para a determinação da mobilidade do ácido pirrol-2-carboxílico registrados em 255. O sinal do analito esta entre os marcadores neutros.



Fonte: autoria própria.

Pela equação de Onsager-Fuoss (Equação A2) descrita abaixo, foi acessada a mobilidade iônica ($\mu_{0,P2C^-}$), empregando a força iônica (I) e conhecendo a mobilidade real pelo método supracitado (Costa *et al.*, 2008):

$$\mu_{act, P2C^-} = \mu_{0,P2C} - [0,23\mu_{0,P2C^-} + 31,3 \cdot 10^{-5}] \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (A2)$$

Para o ácido benzóico, composto selecionado como controle, foi submetido ao mesmo método, em pH 7,3 apenas, onde apresenta-se totalmente ionizado (pKa 4,2), com a finalidade de estimar a acuidade do método por comparação da mobilidade calculada com a encontrada no banco de dados do software PeakMaster via cálculo do erro relativo

**APÊNDICE B – ESTATÍSTICA PELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)
PARA AVALIAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA DOS FATORES UTILIZADOS NO
PLANEJAMENTO DOEHLERT**

Tabela B1 – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento de superfície do tipo Doehlert a três níveis para a β -cciclodextrina (β -CD) e cinco níveis para a temperatura e os ajustes aos modelos linear (L) e quadrático (Q). Fatores significativos destacados em vermelho para um nível de significância de 95%. Siglas: SS = soma dos quadrados; df = graus de liberdade; MS = média da soma dos quadrados.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura (°C) (L)	0.687	1	0.687	0.0140	0.00705
Temperature (°C) (Q)	0.219	1	0.219	0.0448	0.0216
(2) [β -CD] (mmol L ⁻¹) (L)	0.0386	1	0.0386	7.91	0.107
[β -CD] (mmol L ⁻¹) (Q)	1.02	1	1.02	0.0209	0.00474
1L por 2L	0.333	1	0.333	0.681	0.00144
Falta de ajuste	0.0365	1	0.0365	7.46	0.112
Erro puro	0.00978	2	0.00489		
Total SS	2.20	8			

$R^2 = 0.979$