

Validação intralaboratorial de metodologia quantitativa para determinação de L-fenilalanina em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda

Single-laboratory validation of a quantitative methodology for determination of L-phenylalanine in wheat flour by second derivative spectrophotometry

RIALA6/1219

Raquel Linhares CARREIRA¹, Camila Salles RAMOS¹, Lidiane Amorim MUNDIM¹, Letícia Gonçalves LIMA¹, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA², Marialice Pinto Coelho SILVESTRE^{1*}

Endereço para correspondência: Laboratório de Bromatologia-Pesquisa, Departamento de Alimentos Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail: malice@farmacia.ufmg.br

¹Laboratório de Bromatologia-Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,.

²Regra Consultoria e Projetos Ltda.

Recebido: 23.07.2009 – Aceito para publicação: 31.08.2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi validar um método quantitativo para determinação de L-fenilalanina (Fen) em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda. A amostra de farinha de trigo, na quantidade de 0,525g, foi submetida à hidrólise ácida com HCl a 5,7 mol/L, a 110 °C, por 24 h. O material hidrolisado foi reconstituído para 50 mL com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. As soluções preparadas a partir dessa amostra foram submetidas às leituras de absorvância, entre 230 nm e 280 nm, em espectrofotômetro UV/VIS. Os espectros de derivada segunda foram traçados e os valores das áreas dos picos negativos foram utilizados para estimar os teores de Fen. A linearidade do método foi demonstrada na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL (correspondente a teores de 251 mg/100g a 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo). Efeitos de matriz foram observados. A determinação de Fen não sofreu interferência de compostos como L-tirosina e L-triptofano. As porcentagens de recuperação variaram de 81 % a 118 % e os desvios padrão relativos de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram respectivamente 11 % e 15 %, para amostras contendo 354 mg/100g, demonstrando adequada recuperação e precisão do método. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 63 mg/100g e 175 mg/100g. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método para o monitoramento e controle de teores de Fen em farinha de trigo.

Palavras-chave. L-fenilalanina, farinha de trigo, espectrofotometria derivada segunda, validação de métodos.

ABSTRACT

The aim of this paper was the validation of a methodology for determination of L-phenylalanine (Phe) in wheat flour by second derivative spectrophotometry. For this purpose, 0.525g of wheat flour was hydrolyzed with HCl 5.7 mol/L at 110 °C for 24 h. This material was diluted to 50 mL with 0.1 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.0. The solutions prepared from this hydrolyzed were measured on UV/VIS spectrophotometer at wavelength range from 230 nm to 280 nm. The second derivative spectrophotometry's spectra were plotted and the values of the negatives peaks areas were used for estimating the Phe contents. Linearity was demonstrated in the range of 0.010 mg/mL to 0.035 mg/mL (corresponding to 251 mg/100g to 877 mg/100g of Phe in flour). Matrix effects were observed. The Phe determination was not affected by similar compounds such as L-tyrosine and L-tryptofan. The recoveries ranged from 81 % to 118 % and the relative standard deviation under repetitivity and within-reproducibility conditions were 11 % and 15 %, respectively, for samples at 354 mg/100g, showing the adequate recovery and precision of the methodology. The limits of detection and quantification were 63 mg/100g and 175 mg/100g, respectively. The studied parameters indicated that this methodology is suitable for monitoring and controlling of Phe contents in wheat flour

Key words. L-phenylalanine, wheat flour, derivative spectrophotometry, method validation.

INTRODUÇÃO

A Fenilcetonúria (PKU) é uma desordem autossomal recessiva, causada pela deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), resultando em redução ou ausência da conversão da L-fenilalanina (Fen) em L-tirosina e, conseqüentemente, no aumento da produção de metabólitos, tais como, fenilactato, piruvato, ortohidroxi-fenilacetato e feniletilamina^{1,2,3}. O acúmulo desses metabólitos anormais e de Fen no plasma podem ocasionar graves conseqüências no sistema nervoso central, ainda durante a infância, assim como falhas no andar ou falar, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e retardo mental, progressivo e irreversível^{2,3}.

O tratamento da PKU é basicamente dietético e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Fen para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, de acordo com a faixa etária do paciente^{2,3,4,5}. Esta dieta pobre em Fen deve ser iniciada até o terceiro mês de vida do recém-nascido e mantida por toda a vida^{3,6,7,8}.

Dentro do grupo de erros inatos do metabolismo de aminoácidos, a PKU é a manifestação clínica mais encontrada³. A PKU acomete aproximadamente 1:8.000 recém-nascidos na Europa Ocidental, em média 1:10.000 nos Estados Unidos, mas é muito mais rara em japoneses e quase desconhecida em africanos. Já no Brasil, a incidência é de uma criança fenilcetonúrica a cada 15.000 recém-nascidos, ocorrendo variações de prevalência de acordo com a região geográfica^{1,4,5}.

Os produtos designados para grupos especiais de consumidores, como os fenilcetonúricos, devem apresentar, de forma bem especificada, o teor dos componentes cuja ingestão deve ser controlada. Para isto, a dosagem de Fen nos alimentos deve ser realizada empregando-se métodos analíticos confiáveis⁹.

Várias técnicas podem ser utilizadas para dosar o teor de Fen nos alimentos, tais como analisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^{9,10,11}, pelo emprego de um sensor enzimático de membrana, “enzyme membrane sensor”⁸, CLAE hidrofílica¹² e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)⁹.

A espectrofotometria derivada segunda (EDS) é uma técnica analítica simples, rápida e de custo baixo, considerada, por vários autores, como um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade. Baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados^{13,14,15,16}.

Ichikawa e Hiroshi^{17,18,19,20} relataram a eficiência da EDS para medir Fen em proteínas ou em hidrolisados proteicos. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Fen em proteínas e demonstraram que entre 245 nm e 270 nm os resíduos de aminoácidos de L-tirosina e L-triptofano não interferiram significativamente nas propriedades da Fen. Dois anos mais tarde, determinaram Fen, por esta técnica, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, nesta faixa de comprimento de onda, para quantificar os resíduos de Fen em proteínas, desde que variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas^{13,15,16,17,19,20,21,22,23}.

Ressalta-se, ainda, que no laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido, a EDS foi utilizada, com êxito, para a avaliação do grau de exposição²⁴ e para a quantificação de Fen em diversos hidrolisados proteicos^{25,26,27,28,29}.

A farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico quanto industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é restrita, e depende do nível de Fen no soro destes pacientes, pois faz parte dos alimentos de uso proibido para PKU³⁰. Neste sentido, a confiabilidade dos resultados das determinações dos teores Fen em farinhas é determinante para que este alimento seja utilizado de maneira segura nas dietas de fenilcetonúricos.

Apesar de fundamentais para a garantia da confiabilidade dos resultados de ensaios, as validações de métodos ainda têm sido reconhecidas como um dos pontos críticos em sistemas de gestão da qualidade laboratoriais³¹. Processos de validação que fornecem parâmetros de desempenho, indicando adequação para uso de um determinado método, têm dominado as aplicações práticas. Todavia, considerando que estudos de validação são fundamentalmente baseados em testes de hipóteses estatísticas, procedimentos de validação também devem fornecer uma verificação básica de que as premissas, feitas com relação aos princípios destes testes, não sejam violadas³².

Considerando que não existem relatos na literatura sobre o emprego da EDS para a quantificação de Fen em farinha de trigo, bem como, sobre a validação de métodos quantitativos para a análise de Fen em farinha de trigo ou outros alimentos por EDS ou outras técnicas, este trabalho objetivou a validação intralaboratorial de

um método de ensaio com propósito de quantificação de Fen em farinha de trigo por EDS.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Amostras

Foram utilizados 5 pacotes de farinha de trigo tipo I, contendo 1 kg cada, amostrados aleatoriamente e adquiridos em um único comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. Estas amostras da mesma marca e lote foram devidamente homogeneizadas, por quarteamento, e armazenadas em frascos de vidros, devidamente identificados e hermeticamente fechados, sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C.

■ Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Soluções estoque de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano de 0,001 mol/L

As soluções estoque de aminoácidos foram preparadas por pesagem (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e dissolução de 0,0041 g, 0,0045 g e 0,0051 g dos respectivos padrões de Fen, L-tirosina e L-triptofano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para 25 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no mesmo dia dos ensaios, sendo mantidas armazenadas sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

Curva de calibração de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano

Soluções de 0; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL foram preparadas pela diluição de alíquotas de 0; 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 µL (Pipetman P100 e P1000) das respectivas soluções estoque para 5 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no momento dos ensaios.

Tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0

O fosfato de sódio monobásico (solução A) (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 24,01 g e 28,40 g de fosfato de sódio bibásico (solução B) (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram pesados (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e diluídos, separadamente, para 1000 mL de água destilada e deionizada, em balão volumétrico. Estas soluções foram

utilizadas no ajuste do pH para 7,0 (Potenciômetro, Quimis, Q 400 A, Diadema, SP, Brasil). Esta solução tampão foi preparada no mesmo dia dos ensaios, sendo armazenada sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

Solução de ácido clorídrico 5,7 mol/L

Ácido clorídrico concentrado 37 % (Synth, Diadema, SP, Brasil) (48 mL) foi diluído com 52 mL de água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e mantida armazenada entre 20 °C e 30 °C.

Solução de hidróxido de sódio 3 mol/L

O hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 120,00 g foi pesado (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e dissolvido em água destilada e deionizada, em banho de gelo, e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e mantida armazenada entre 20 °C e 30 °C.

■ Procedimento analítico

Hidrólise ácida

A farinha de trigo tipo I foi submetida à hidrólise sob vapor ácido (HCL a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) para liberação da Fen. Assim, pesou-se 0,525 g de farinha de trigo (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China), quantidade esta que foi uniformemente distribuída em 12 tubos de borossilicato de 0,5 cm de diâmetro (Hialoquímica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Estes tubos foram agrupados em um frasco maior, ao qual foi adicionado 0,75 mL de HCl a 5,7 mol/L. Este frasco foi fechado, mantido sob vácuo por 30 min e levado para hidrólise à 110 °C em estufa (Quimis, Q-317B- 12, Diadema, SP, Brasil), por 24 h. O material presente nos tubos foi reconstituído em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0. Seguiu-se o ajuste do pH para 7,0 (pHmetro Quimis, Q 400 A, Diadema, SP, Brasil) com solução de hidróxido de sódio a 3 mol/L e a transferência para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0. A amostra hidrolisada foi filtrada (papel de filtro qualitativo, J.Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e armazenada sob refrigeração até o momento do uso. Desta solução de farinha hidrolisada, foram retirados 1,9 mL completando-se o volume para 5 mL em balão

volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

Determinação espectrofotométrica da L-fenilalanina

As soluções foram submetidas às leituras de absorvância entre 230 nm e 280 nm em espectrofotômetro CECIL (modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra), para cobrir a faixa de absorção da Fen que varia de 245 nm a 270 nm¹⁶. Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Neste intervalo, a Fen apresentou picos negativos na derivada. A área do pico de maior amplitude, situado entre 255 nm e 260 nm, foi escolhida para ser integrada. Os valores das áreas correspondentes foram utilizados, na análise de regressão, para o cálculo do teor de Fen na farinha de trigo.

■ Procedimento de validação

Os parâmetros linearidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação do equipamento foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão e materiais de referência. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos. O procedimento de validação adotado foi baseado em um delineamento experimental simples e testes estatísticos robustos, incluindo verificações das premissas relacionadas a cada teste^{33,34,35}. O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

Linearidade

Avaliação da linearidade foi conduzida conforme procedimentos propostos por Souza & Junqueira³⁶. Uma curva de calibração foi preparada, nos níveis de concentração 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL de Fen em tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,0 (correspondentes a 251, 376, 501, 627, 752 e 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo), sendo três replicatas independentes de cada nível. As soluções foram analisadas em ordem aleatória. Brancos foram preparados em triplicata para avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos da regressão.

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados para investigação de perfis óbvios, sendo indicados como *outliers* (valores

dispersos) os pontos fora do intervalo $\pm t_{(0,975;n-2)} s_{res}$, sendo s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão³⁷. Os *outliers* foram formalmente diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife³⁸. Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22 % no número original de resultados³⁹. As premissas relativas à análise de regressão foram verificadas sendo: normalidade⁴⁰, homoscedasticidade^{41,42} e independência dos resíduos da regressão⁴³. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade⁴⁴.

Efeitos de matriz

Para verificação dos efeitos de matriz, duas curvas de calibração foram estudadas nos níveis de 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL, sendo cada nível em três replicatas independentes, e analisadas em ordem aleatória, na mesma bateria analítica. A curva usual do analito foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade. Para a curva do analito na matriz utilizou-se 1,9 mL de extratos hidrolisados de amostras de farinha de trigo adicionados de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μ L da solução estoque de Fen, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0. Os brancos preparados para cada curva não foram incluídos nos cálculos.

Os parâmetros da regressão foram estimados e as premissas relativas ao MMQO também foram verificadas para estas curvas. Uma vez comprovadas as premissas e o ajuste ao modelo linear, a inclinação e a interseção obtidas para a curva usual foram comparadas com aquelas calculadas para a curva em matriz. A premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de F⁴⁵, para verificar se inclinações e interseções seriam comparadas pelo teste de t com as variâncias combinadas ou distintas⁴⁶.

Seletividade

Para complementar os estudos de efeitos de matriz, nos quais foram considerados interferentes oriundos das amostras, reagentes e materiais envolvidos nos ensaios, a seletividade também foi investigada por meio de experimentos com Fen na presença e ausência de outros aminoácidos aromáticos.

Três curvas de calibração foram construídas, sendo de L-tirosina, L-triptofano e Fen, cada uma com 3

pontos (0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL), em triplicata. Em seguida, três outras curvas de calibração foram preparadas, sendo a primeira contendo um *pool* dos três aminoácidos, a segunda com Fen associada à L-tirosina e a terceira composta por Fen e L-triptofano, todas nas concentrações de 0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL, em triplicata.

Exatidão, precisão e limites

Devido à inexistência de materiais de referência certificados devidamente caracterizados para Fen em farinha de trigo, os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) foram pesquisados em ensaios com materiais de referência (amostras previamente caracterizadas por CLAE no nível de 354 mg/100g, representativas dos níveis reportados para Fen em farinha de trigo em tabelas de composição centesimal, com valores médios de 400mg de Fen/100g de farinha de trigo) ⁴⁷. Doze replicatas independentes destas amostras foram divididas em quatro lotes, com três replicatas cada, analisadas em quatro diferentes dias, por dois analistas. As concentrações de Fen foram preditas por meio de equações obtidas pelo método de adição de padrão de Fen nas amostras, devido aos resultados dos estudos de efeitos de matriz.

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs ^{48,49,50}. As estatísticas de Grubbs para um outlier (G_1), dois outliers vicinais (G_2) e dois outliers polares (G_3) foram calculadas simultaneamente para os resultados obtidos no nível de concentração estudado. A indicação de *outlier* por, pelo menos, uma destas estatísticas seria suficiente para excluir o dado. Após um primeiro ciclo, o teste de Grubbs foi sucessivamente aplicado até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22 % no número original de resultados de recuperação ³⁹.

Inexatidão foi investigada por meio da média de recuperação obtida para as replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado, após o diagnóstico de *outliers*. O critério de aceitabilidade adotado foi de média de recuperação entre 80 % a 110 % ⁵¹.

As precisões sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram expressas em termos de desvios padrão relativos e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado ^{52,53,54,55}. As premissas de normalidade ⁴⁰ e homoscedasticidade dos resíduos

dos resultados de recuperação ^{41,42}, relativas à análise de variância, foram previamente testadas. Devido a indisponibilidade de farinha de trigo sem o analito Fen, os limites de detecção e de quantificação teóricos foram estabelecidos como a média das leituras obtidas para branco de solvente mais três e dez desvios padrão, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da linearidade estão demonstrados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e na Tabela 1. As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal são homoscedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado do MMQO sem ponderações.

Tabela 1. Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL)

Estatística	Curva Usual
<i>Regressão</i>	
F	$1,146 \times 10^3$
F_{critico}	4,600
p	$p < 0,001$
<i>Desvio da linearidade</i>	
F	1,711
F_{critico}	3,478
p	$p > 0,05$

F = razão entre variâncias, F_{critico} = valor crítico tabelado, p = significância

A Figura 1 ilustra os gráficos exploratórios dos resíduos da regressão com indicação dos *outliers* tratados. Os perfis destes gráficos de resíduos demonstraram que não houve tendências óbvias que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os intervalos de confiança dos resíduos ($\pm t_{(0,975;n-2)} s_{\text{res}}$) sugeriram a presença dois *outliers*, sendo um no nível 0,020 mg/mL e outro no nível 0,035 mg/mL, os quais foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

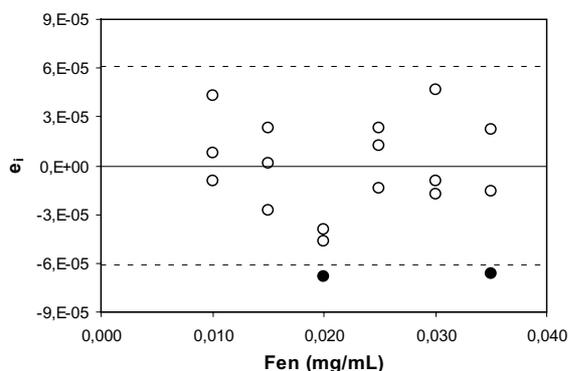


Figura 1. Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL), com indicação dos respectivos outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

$$e_i = \text{resíduo da regressão}, \bullet = \text{outlier}, \text{---} = \pm t_{(0,975;n-2)} S_{res}$$

O gráfico de Ryan-Joiner, ilustrado na Figura 2, indicou correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos para cada curva e os valores normais teoricamente esperados. O coeficiente de correlação foi de 0,9895, com valor crítico de 0,9529, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo ($p > 0,10$).

A premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi confirmada. A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma

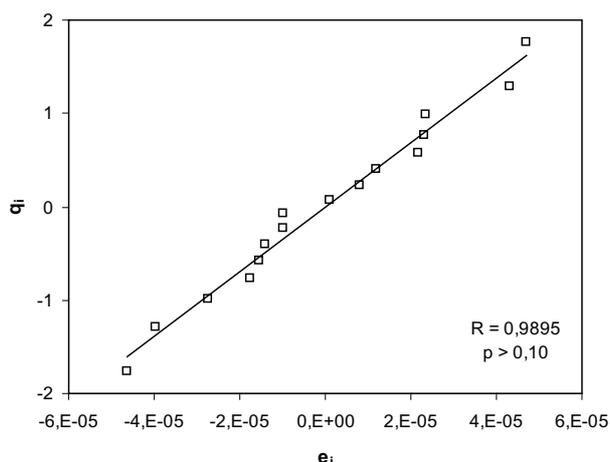


Figura 2. Gráfico de probabilidade normal da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL).

e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância do desvio da distribuição normal.

vez que a estatística t de Levene, estimada em 0,676, não foi significativa ($p > 0,05$) (Figura 3).

Houve independência dos resíduos da regressão. A estatística de Durbin-Watson calculada foi de 1,592 ($p > 0,10$), sugerindo que não houve autocorrelação (Figura 4).

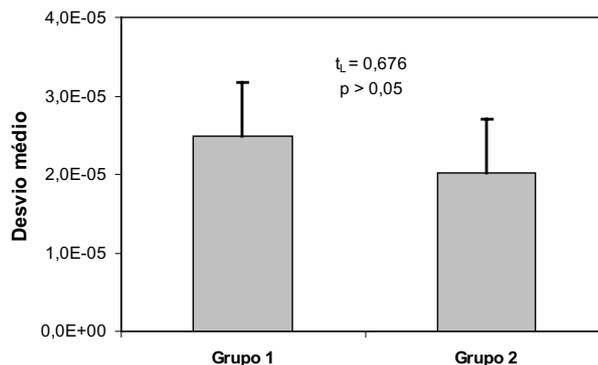


Figura 3. Representação da homogeneidade das variâncias da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL) pelo teste de Levene modificado.

t_L = estatística t de Levene, p = significância, Grupo 1 = 0,010; 0,015 e 0,020 mg/mL, Grupo 2 = 0,025; 0,025 e 0,030 mg/mL.

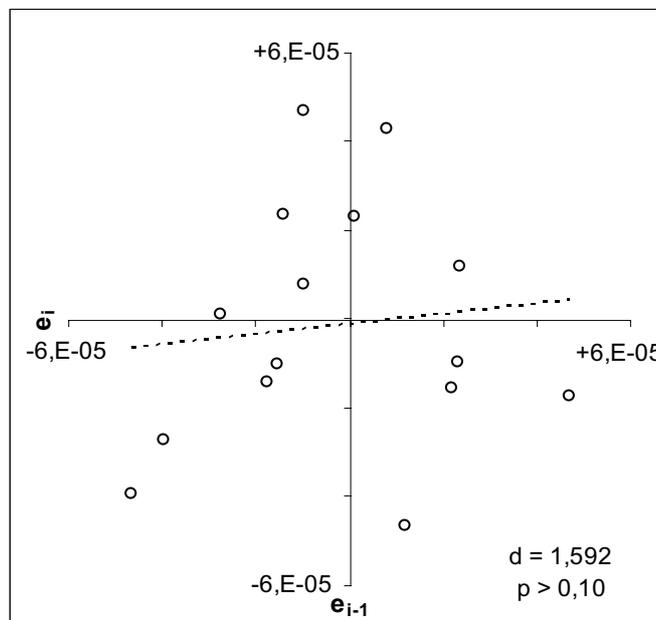


Figura 4. Gráfico de Durbin-Watson da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL).

e_i = resíduo da regressão, d = estatística de Durbin-Watson, p = significância.

A regressão apresentou-se altamente significativa ($p < 0,001$), enquanto o desvio de linearidade não foi significativo ($p > 0,05$) (Tabela 1), indicando linearidade na faixa estudada de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL. A curva de calibração com respectiva equação e coeficiente de determinação está ilustrada na Figura 5.

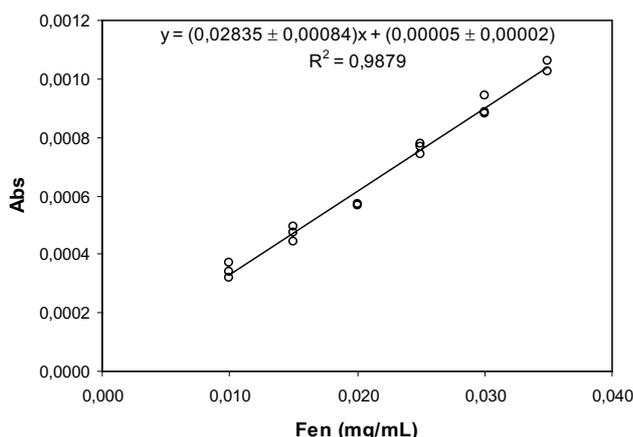


Figura 5. Curva de calibração da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação.

Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Fen em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação

■ Efeitos de matriz

As curvas de calibração usual e em matriz, com respectivas equações e coeficientes de determinação, obtidas nos estudos de efeitos de matriz estão apresentadas na Figura 6. Pelo teste de resíduos padronizados Jackknife foram detectados um *outlier* na curva usual e outro *outlier* na curva de matriz, ambos no nível 0,035 mg/mL. Todas as premissas relativas ao MMQO foram confirmadas para as curvas de calibração usual e em matriz. Distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$). Homoscedasticidade foi obtida com estatísticas t de Levene não significativas ($p > 0,05$). Independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson ($p > 0,10$). Regressões significativas ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram diagnosticados pelos testes de F da análise de variância. Estes resultados (Tabela 2) permitiram a comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação dos efeitos de matriz.

O teste de F indicou heterogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e em matriz (

Tabela 2. Avaliação da linearidade das curvas de calibração de Fen usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, nos experimentos de efeitos de matriz

Estatística	Curva Usual	Curva em Matriz
Número de observações		
n	17	17
Normalidade		
R	0,9770	0,9922
$R_{\text{cítrico}}$	0,9549	0,9549
p	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Homoscedasticidade		
t_l	0,766	-1,681
$t_{\text{cítrico}}$	2,131	2,131
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Independência		
d	1,775	1,616
p	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Regressão		
F	$5,540 \times 10+2$	$1,767 \times 10+2$
$F_{\text{cítrico}}$	4,543	4,543
p	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Desvio da linearidade		
F	3,268	2,522
$F_{\text{cítrico}}$	3,357	3,357
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$

n = número de observações, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, t_l = estatística t de Levene, d = estatística de Durbin-Watson, F = razão entre variâncias, estatísticas críticas = valores críticos tabelados.

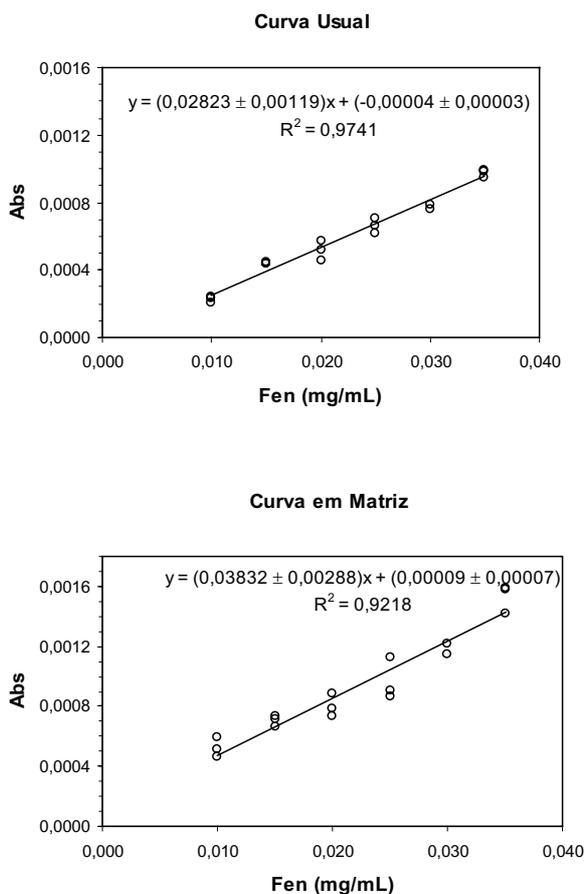


Figura 6. Curvas de calibração de Fen usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectivas equações e coeficientes de determinação.

Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Fen em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação

$F = 5,882$, com $p = 0,001$) e o uso do teste de t com variâncias distintas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, não houve diferença significativa quando as interseções da curva usual e em matriz foram comparadas entre si ($p > 0,05$). Contudo, as inclinações diferiram significativamente ($p < 0,05$), indicando efeitos de matriz (Tabela 3). Com base nestes resultados, foi possível inferir que curvas usuais de Fen não forneceram as mesmas respostas que amostras de farinha de trigo contendo Fen nas mesmas concentrações. Diferença significativa entre os interceptos era esperada, pois não havia disponibilidade de amostras de farinha de trigo isentas de Fen. Esta diferença corresponderia ao teor prévio do aminoácido presente nos extratos da farinha utilizados para preparo de cada ponto da curva de calibração em matriz. A ausência de diferença significativa entre os interceptos provavelmente ocorreu devido a efeitos de compostos presentes na amostra, com

ação supressora sobre a Fen. Houve ainda a diferença significativa entre as inclinações, o que reiterou a indicação de presença de interferentes oriundos da matriz. Para que tais interferências fossem consideradas de maneira a não afetarem os resultados de Fen nas amostras de farinha, o método de adição foi adotado. Ou seja, para quantificação de Fen em amostras, sete alíquotas de 1,9 mL foram retiradas de cada solução de amostra hidrolisada, adicionadas de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μ L da solução estoque de Fen, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

■ Seletividade

Quando as curvas de calibração de L-tirosina e L-triptofano foram lidas nas condições experimentais para determinação de Fen não houve detecção. Além disto, evidenciou-se que os espectros de Fen não foram afetados pela presença dos outros aminoácidos aromáticos estudados. As respostas obtidas para as curvas de Fen associada à L-tirosina e L-triptofano isoladamente e para aquela preparada com uma mistura destes três aminoácidos, não diferiram daquelas observadas para Fen na ausência destes compostos (Figura 7). Tais resultados indicaram a seletividade do método, confirmando a capacidade de determinar o analito em estudo na presença de outros compostos de comportamento similar.

Tabela 3. Comparações entre as interseções e inclinações das curvas usual e em matriz para Fen

Estatística	Curva Usual
<i>Interseção</i>	
t_a	1,714
$t_{critico}$	2,093
p	$p > 0,05$
<i>Inclinação</i>	
t_b	3,237
$t_{critico}$	2,093
p	$p < 0,05$

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, $t_{critico}$ = valor crítico tabelado, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância.

■ Exatidão, precisão e limites

O teste de Grubbs não indicou presença de *outliers* ($p > 0,05$) entre os resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostra analisadas no nível de concentração estudado. Os valores estimados para G_1 foram 0,945 e 1,848, para a menor e maior recuperação, respectivamente, com valor crítico de 2,285. O valor estimado para G_2 foi de 2,79, com valor tabelado de 3,91. Para G_3 os valores estimados para as duas menores e para as duas maiores recuperações,

respectivamente de 0,1933 e 0,5910, também foram inferiores ao valor tabelado de 0,7004.

Os valores individuais de recuperação variaram de 81 % a 118 %. O perfil destes resultados de recuperação individuais nos quatro diferentes ensaios pode ser observado na Figura 8. A média de recuperação alcançada para as doze replicatas de amostra contendo 354 mg/100g de Fen em farinha de trigo foi de 94 %, atendendo aos critérios estabelecidos de 80 % a 110 % (EC, 2002). Estes resultados

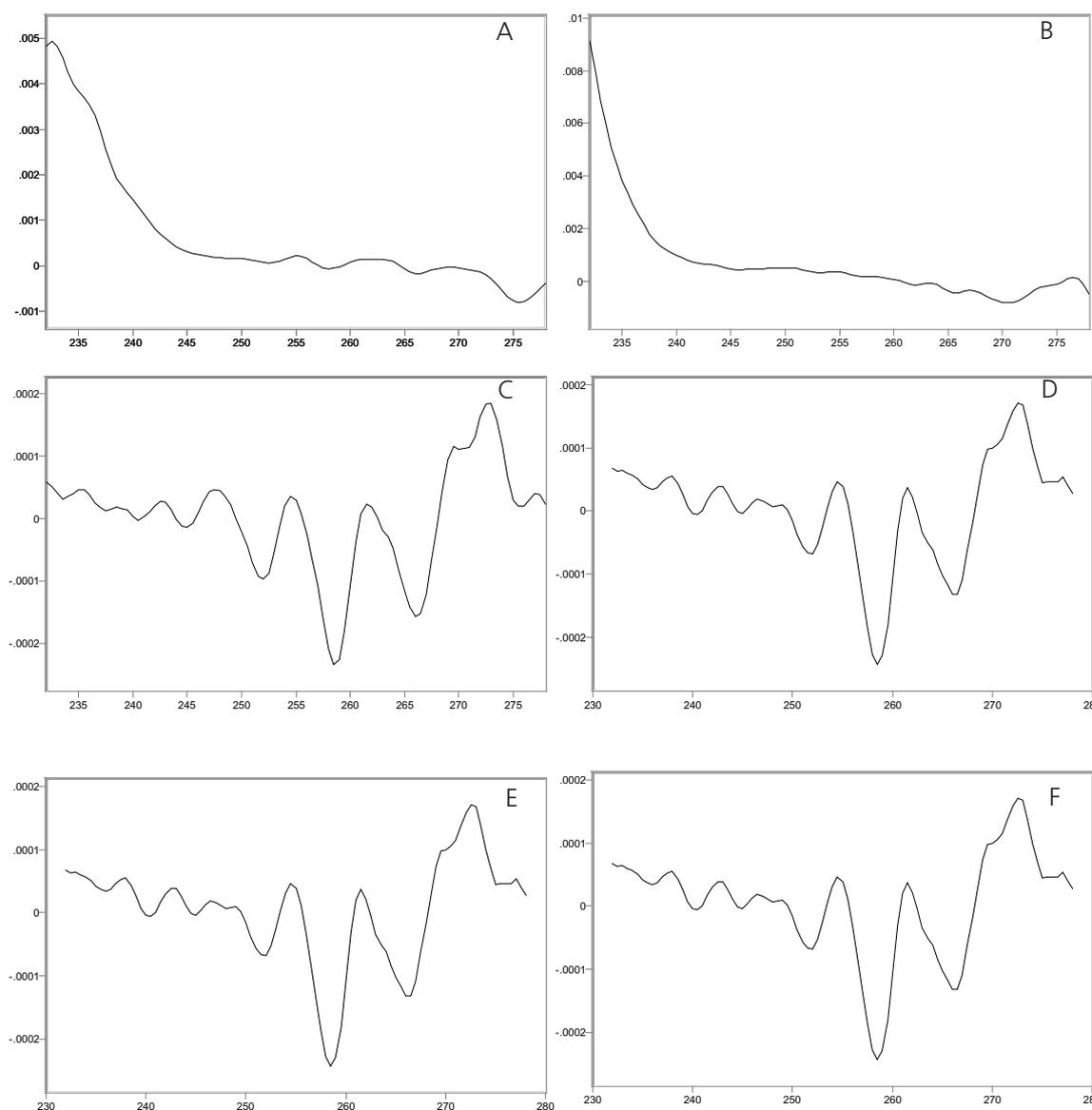


Figura 7. Espectros obtidos para as soluções de 0,035 mg/mL utilizadas no estudo de seletividade, sendo: A = solução de L-tirosina, B = solução de L-triptofano, C = solução combinada de Fen e L-tirosina, D = solução combinada de Fen e L-triptofano, E = solução pool de Fen, L-tirosina e L-triptofano, e F = solução de Fen.

indicaram que a recuperação do método é adequada e que o mesmo não é inexato no nível de estudado.

Os resíduos, obtidos pela diferença entre a recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada dia, apresentaram distribuição normal, com coeficiente de correlação de Ryan-Joiner de 0,9742 ($p > 0,10$), e homoscedasticidade, com estatística F_L de 0,183 ($p > 0,05$), permitindo a estimativa de DPR_r e DPR_R por análise de variância.

Os valores de DPR_r e DPR_R , estimados por análise de variância, foram 11 % e 15 %, respectivamente, sinalizando a precisão do método.

O limite de detecção teórico foi de 63 mg/100g, enquanto que o de quantificação foi de 175 mg/100g. Estes limites foram, provavelmente, subestimados, uma vez que os experimentos foram conduzidos com branco de reagentes. De qualquer forma, a faixa de validação do método encontra-se acima destes valores, ou seja, de 251 mg/100g a 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo.

CONCLUSÃO

Linearidade foi determinada, com efeitos de matriz significativos, em uma faixa de concentração compatível com os níveis usualmente reportados para Fen em farinha de trigo. Comprovou-se seletividade, recuperação e precisão do método, com limites de detecção e quantificação teóricos suficientes para determinação do analito. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método para o propósito de monitoramento dos teores de Fen em farinha de trigo.

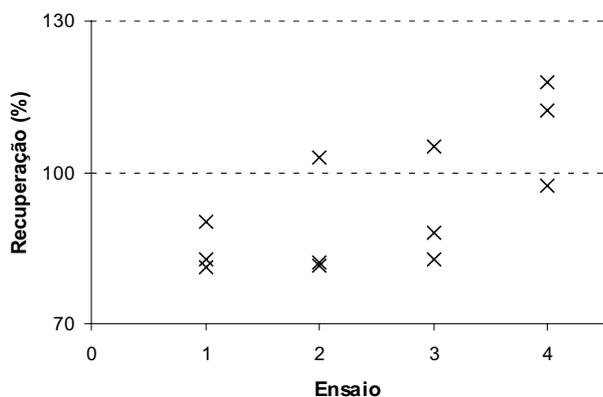


Figura 8. Porcentagens de recuperação individuais obtidas para as doze replicatas de amostra (contendo 354 mg/100g de Fen em farinha de trigo), analisadas em quatro ensaios, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

REFERÊNCIAS

1. Ramaswami U, Smith I. Phenylketonuria. *Curr Paediatrics*. 1997; 7: 251-255.
2. Starling ALP, Aguiar MJB, Kanufre VC, Soares SF. Fenilcetonúria. *Rev Méd Minas Gerais*. 1999; 9: 106-10.
3. Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Publ*. 2000; 34: 86-96.
4. Hendriksz CJ, Walter JH. Update on phenylketonuria. *Curr Paediatrics*. 2004; 14: 400-6.
5. Marco D, Waitzberg DL. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 449-57.
6. Lopez-Bajonero LJ, Lara-Calderon P, Galvez-Mariscal A, Velasquez-Arellano A, Lopez-Munguia A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J Food Sci*. 1991; 56: 938-42.
7. Martins AM, Fisberg RM, Schmidt BJ. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. São Paulo: Nestlé; 1993.
8. Shimamura S, Tamura Y, Miyakawa H, Saito H, Kawaguchi Y, Isomura N, et al. Peptide mixture and products thereof. Moringa Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 1997 Apr 14; 1999 Sep 14.
9. Piecyk M, Srama A, Bzducha A, Obiedzinski M. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2007; 6(2): 5-18.
10. Keohane PP, Grimble GK, Brown B, Spiller RC. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*. 1985; 26: 907-13.
11. Grimble GK, Keohane PP, Higgins BE, Kaminsk Jr MV, Silk DBA. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin Sci*. 1986; 71: 65-9.
12. Carreira RL, Barbosa CMS, Junqueira RG, Motta S, Silvestre MPC. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22 (3): 229-32.
13. O'Haver TC, Green GL. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal Chem*. 1976; 48 (2).
14. Ragone R, Colonna G, Balestrieri C, Servillo L, Irace G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. *Biochem*. 1984; 23: 1871-5.
15. Grant A, Bhattacharyya PK. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J Chromatog A*. 1985; 347: 219-35.
16. Rojas FS, Ojeda CB, Pavon JMC. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. 1988; 35: 753-61.
17. Ichikawa T, Terada H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 494: 267-70.
18. Ichikawa T, Terada H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim Biophys Acta*. 1979; 580: 120-8.
19. Ichikawa T, Terada H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem Pharm Bull*. 1981; 29 (2): 438-44.

20. Ichikawa T, Terada H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 671 (1): 33-7.
21. Brandts JF, Kaplan LJ. Derivate spectroscopy applied to tyrosiyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem*. 1973; 12 (10): 2011-24.
22. Matsushima A, Inoue Y, Shibata K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal Biochem*. 1975; 65 (3): 362-68.
23. Cahill JE, Padera FG. Derivative analysis of UV/visible spectra. *American Laboratory*. 1980; 12: 101-12.
24. Morais HA, Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim*. 2005; 34 (1): 59-69.
25. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobiango M, Vieira CR, Silva VDM, Januário JN, Aguiar MJB, Silvestre MPC. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac Bonaer*. 2006; 25: 325-32.
26. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit Food J*. 2005; 107 (1): 42-53.
27. Capobiango M, Lopes DCF, Carreira RL, Afonso WO, Segall SD, Silvestre MPC. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2007; 3: 1-19.
28. Lopes DCF, Bizzotto CS, Silva VDM, Afonso WO, Lopes Jr CO, Silvestre MPC. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J Food Technol*. 2008; 6: 57-65.
29. Vieira CR, Lopes Jr CO, Ramos CS, Capobiango M, Silvestre MPC. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2008; 28: 599-606.
30. NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. [acesso em: 15 de outubro de 2008]. Disponível em: <<http://www.nupad.medicina.ufmg.br>>.
31. King B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. LGC Limited. 2003.
32. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002; 74: 835-55.
33. Souza SVC, Lima JA, Teodoro JC, Junqueira RG. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27 (4): 787-92.
34. Souza SVC, Pinto CT, Junqueira RG. In-house method validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20: 241-47.
35. Souza SVC, Junqueira RG, Ginn R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) - In-house method validation. *J Chromatogr A*. 2005; 1077: 151-8.
36. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 552: 25-35.
37. Meyer PC, Zund RE. Statistical methods in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons; 1993.
38. Belsley DA, Kuh E, Welsch RE. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley; 1980.
39. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl Chem*. 1995; 67: 331-43.
40. Ryan TA, Joiner BL. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University; 1976.
41. Levene H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford: Stanford University Press; 1960. p. 278-92.
42. Brown MB, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variance. *J Am Stat Assoc*. 1974; 69: 364-7.
43. Durbin J, Watson GS. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*. 1951; 38: 159-78.
44. Draper N, Smith H. Applied regression analysis. New York: Wiley; 1998.
45. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. Ames: Iowa State University; 1989.
46. Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1994.
47. USDA (United States Department of Agriculture). Human Nutrition Information Service. Agriculture Handbook. Composition of Foods: Cereal Grains and Pasta. Number 8-20, 1989. Modified From Drake, D.L., S.E. Gebhardt, R.H. Matthews. Updated: Friday, May 26, 2006. [acesso em: 08 de junho de 2008]. Disponível em: <<http://food.oregonstate.edu/g/comp/compa.html>>.
48. Grubbs F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*. 1969; 11: 1-21.
49. Barret V, Lewis T. Outliers in statistical data. 3 ed. New York: John Wiley; 1994.
50. Burke S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC GC*. 2001; 19-24.
51. EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
52. ISO (International Standards Organization). ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Parts 1, 2, 3, 4 and 6. Geneva: ISO; 1994.
53. ISO (International Standards Organization). ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5. Geneva: ISO; 1998.
54. Kuttatharmmakul S, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Comparison of alternative measurement methods. *Anal Chim Acta*. 1999; 391: 203-25.
55. Maroto A, Riu J, Boqué R, Rius FX. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal Chim Acta*. 1999; 391: 173-85.