

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS EM AMOSTRAS  
DE PLANTAS EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO***

**DANIEL BATISTA DE OLIVEIRA\***

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de MESTRE EM QUÍMICA (área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA)

**Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira**

**\*bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS - SP  
2005**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48da

Oliveira, Daniel Batista de.

Determinação de aminoácidos totais em amostras de plantas empregando multicomutação / Daniel Batista de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Química analítica. 2. Aminoácidos. 3. Multicomutação. 4. Análise por injeção de fluxo. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

*“Faça as coisas o mais simples possível,  
e não as mais simples.”*

*Albert Einstein.*

## *Agradecimentos:*

Agradeço a Deus,

A minha família, meus dois irmãos Gustavo e Renata, e especialmente ao meu pai Homero Alves de Oliveira por todo apoio, incentivo, e amizade;

A minha orientadora Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pela oportunidade, por todo apoio, incentivo e dedicação prestada durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega por todo o apoio e pela ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os integrantes e, também a todos os ex-integrantes do nosso grupo o Gaia – Grupo de Análise Instrumental Aplicada pela amizade e convivência;

Aos funcionários e estagiários da EMBRAPA Pecuária Sudeste, pelo apoio e amizade;

Ao engenheiro Luiz Francisco de Matteo Ferraz, da EMRAPA Instrumentação Agropecuária, pelo desenvolvimento do programa controlador do sistema e por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSCar pela oportunidade;

Ao meu amigo Gustavo Rocha pelo incentivo e pelo apoio prestado para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos de São Carlos: Vinícius, Raphael, Darley, André, Cássio, Leonardo, Guto e Tiago pela amizade e convivência durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os meus amigos que de forma direta ou indireta ajudaram para a conclusão deste trabalho;

***Muito Obrigado!***

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Valores de pK' dos grupos ionizáveis de alguns aminoácidos a 25°C...	03
Tabela 3.1 - Programa de execução usado para determinação de aminoácidos totais.....	24
Tabela 3.2 - Seqüência de acionamento das válvulas solenóides e da bomba peristáltica.....	27
Tabela 3.3 - Programa usado para limpeza da alça de amostragem.....	28
Tabela 3.4 - Variáveis estudadas com seus níveis baixo e alto para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> .....	29
Tabela 3.5 - Variáveis estudadas em seus níveis baixo e alto para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> + estrela.....	30
Tabela 3.6 - Programa utilizado para moagem criogênica das amostras.....	32
Tabela 4.1 - Planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> utilizado para otimização do sistema de multicomutação proposto.....	38
Tabela 4.2 - Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> + estrela utilizado para otimização do sistema proposto.....	39
Tabela 4.3 - Resultados obtidos no teste de adição e recuperação para as respectivas amostras.....	51
Tabela 4.4 - Resultados obtidos no sistema proposto para as respectivas amostras.....	51

## Lista de Figuras

Figura 1.1 - Classificação dos vinte aminoácidos e suas respectivas cadeias laterais.....	05
Figura 2.1 - Reação entre aminoácidos e ninidrina.....	12
Figura 2.2 - Análise por injeção em fluxo.....	15
Figura 2.3 - Mecanismo da reação entre $\alpha$ - aminoácidos e ninidrina para formar o Ruhemann's Purple e outros produtos.....	15
Figura 2.4 - Esquema representando o elétron deslocalizado e o mecanismo de hidrólise para formação do Ruhemann's Purple em solução ácida.....	16
Figura 3.1 - Válvulas solenóides de três vias utilizadas no sistema para adição das soluções no percurso analítico.....	20
Figura 3.2 - Foto do sistema utilizado.....	21
Figura 3.3 - Tela do programa MultiSwitch utilizado no sistema de multicomutação para o controle do processo analítico.....	22
FIGURA 3.4 - Diagrama de blocos representando a operação do programa proposto.....	23
FIGURA 3.5 - Sistema de multicomutação proposto para determinação de aminoácidos totais.....	25
Figura 3.6 - Foto do desborbulhador usado no sistema de multicomutação.....	26
FIGURA 3.7 - Diagrama de tempo de acionamento para as respectivas válvulas V1 a V5.....	28
Figura 3.8 - Sistema em fluxo utilizado para determinação de amônia nas amostras.....	31
Figura 4.1 - Efeito do aumento do volume da amostra na absorbância.....	35
Figura 4.2 - Efeito do volume da ninidrina na absorbância.....	36
Figura 4.3 - Efeito da concentração da ninidrina na absorbância.....	37
Figura 4.4 - Gráfico de Pareto representando a influência das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial $2^5$ .....	40
Figura 4.5 - Gráfico de Pareto representando a influência das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial $2^3$ + estrela.....	41

Figura 4.6 - Gráfico de superfície de resposta estimada para volume da ninidrina e volume da amostra.....	42
Figura 4.7 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão cisteína $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	43
Figura 4.8 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão leucina $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	44
Figura 4.9 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão cistina $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	44
Figura 4.10 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão arginina $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	45
Figura 4.11 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão glicina $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	45
Figura 4.12 - Curva analítica para análise de amônia na amostra.....	47
Figura 4.13 - Curva analítica para padrão cisteína.....	48
Figura 4.14 - Sinal analítico gerado no sistema de multicomutação proposto.....	49
Figura 4.15 - Curva analítica para 4 – aminoantipirina.....	50

## Resumo

Neste trabalho, propõe-se o desenvolvimento de um sistema de multicomutação para determinação de aminoácidos totais em amostras de plantas. O sistema se baseia na reação de complexação dos grupos funcionais amino dos aminoácidos pela ninidrina. Como sistema de detecção foi utilizado espectrofotômetro que opera na região do visível. O sistema de multicomutação desenvolvido empregou cinco válvulas solenóides de três vias para controlar a manipulação das soluções e uma bomba peristáltica para propulsão dos fluidos. O tempo e a seqüência de acionamento das válvulas, a velocidade da bomba peristáltica e a aquisição dos dados, realizados através de um programa dedicado, desenvolvido em plataforma Labview, utilizando um microcomputador equipado com uma interface eletrônica. O sistema apresentou faixa linear de trabalho até  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com desvio padrão relativo de 1,09% ( $n=10$ ), freqüência de amostragem de 15 determinações por hora e limite de detecção estimado de  $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . O sistema foi aplicado em amostras de plantas e os resultados obtidos com testes de adição e recuperação variaram entre 96 e 101%.



## Abstract

In this work, development of a multicommutation system for the determination of total amino acids in samples of plants were proposed. The system is based on the complexation of amino functional groups of amino acids by ninhydrin. As system detection was used an spectrophotometer working in the visible range. The multicommutation developed system employed five solenoid valves for solution management and a peristaltic pump for the fluid propulsion. The time and sequence of switching of valves, the velocity of peristaltic pump and the data acquisition were performed through the development program in the Labview plataform using a computer with an eletronic interface. The system shows a linear reponse up to  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , with relative standard deviation of 1.09% ( $n = 10$ ), , sample troughput of 15 determinations per hour and a detection limit of  $3.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . The system was applied to plant samples and the results obtained using the standard addition test presented receiver between 96 and 101%.

## Sumário

1. Introdução .....	2
2. Revisão de Literatura .....	9
2.1 Extração de aminoácidos .....	9
2.2 Determinação de aminoácidos .....	9
2.3 Análise em Fluxo .....	11
2.4 Planejamento Fatorial.....	12
2.5 Condições da reação analítica .....	13
3. Material e Métodos .....	18
3.1 Soluções.....	18
3.1.1 Solução tampão.....	19
3.1.2 Solução de Ninidrina .....	19
3.2 Instrumentação.....	20
3.2.1 Método .....	20
3.2.2 Equipamentos e acessórios .....	20
3.2.3 Descrição do Programa de Execução .....	22
3.2.4 Funcionamento do módulo de análise e estudo das variáveis do sistema.	25
3.2.5 Planejamento Experimental.....	29
3.3 Teste de Interferentes .....	30
3.4 Amostras .....	31
4. Resultados e Discussão .....	34
4.1 Preparo da Amostra .....	34
4.2 Estudos relacionados à otimização das variáveis do sistema .....	34
4.3 Teste de interferentes.....	46
4.4 Aplicação Analítica .....	48
4.5 Tratamento de Resíduo.....	52
5. Conclusões.....	54
6. Referências Bibliográficas .....	63

## *INTRODUÇÃO*

---

## 1. Introdução

Os aminoácidos são as unidades fundamentais das proteínas presentes nos organismos dos animais, dos vegetais e dos seres humanos. Essas proteínas são constituídas de um mesmo conjunto de vinte aminoácidos, unidos covalentemente em seqüências características. Cada aminoácido possui uma cadeia lateral que lhe confere uma individualidade química. Esses vinte aminoácidos podem se combinar de diferentes formas e seqüências para formar os peptídeos e as proteínas com propriedades e atividades muito diferentes entre si. A partir dos aminoácidos que formam a estrutura protéica, diferentes organismos podem construir produtos amplamente diversos como enzimas, hormônios, proteínas do cristalino ocular, penas, teias, as proteínas nutritivas do leite, antibióticos, e muitas outras substâncias que têm atividade biológica característica (LEHNINGER, 1984).

Os organismos vivos diferem a respeito das formas de nitrogênio utilizadas como precursores dos aminoácidos. Como exemplo, os seres humanos podem sintetizar apenas dez dos vinte aminoácidos necessários na biossíntese das proteínas, sendo que os outros dez aminoácidos devem ser obtidos através dos alimentos. Por outro lado, algumas plantas podem sintetizar os vinte aminoácidos para a síntese das proteínas (LEHNINGER, 1984).

Quanto à classificação, os aminoácidos estão divididos em quatro grupos, assim divididos o grupo dos apolares, os polares, os ácidos e os básicos (CONN, 1980).

Essa classificação dos aminoácidos é baseada no valor do ponto isoelétrico (pI). Ao se dissolver um aminoácido neutro em água destilada, ele estará presente quase que exclusivamente na forma de íon dipolar, isto é, a carboxila está quase que totalmente dissociada, enquanto o grupo amino estará praticamente protonado. Como nessas condições o aminoácido aparenta ser neutro, isto é, não migra em um campo elétrico, designa - se o valor do pH no qual ele mostra este comportamento como ponto isoelétrico (pI). Pode - se demonstrar que em um aminoácido neutro este valor de pI é a média aritmética dos dois valores de pK' (DOSE, 1982).

$$pI = \frac{pK'_1 + pK'_2}{2}$$

2

O valor de  $pK'$  referente à carboxila é designado como valor de  $pK'_1$ . O valor de  $pK'$  do grupo amino, como valor de  $pK'_2$ , enquanto o eventual  $pK'$  da cadeia lateral recebe a designação de  $pK'_R$ . A tabela 1.1 mostra os valores de  $pK'$  de alguns aminoácidos (DOSE, 1982).

Tabela 1.1 – Valores de  $pK'$  dos grupos ionizáveis de alguns aminoácidos a 25°C.

<b>Aminoácido</b>	<b><math>pK'_1</math></b> <b><math>\alpha - COOH</math></b>	<b><math>pK'_2</math></b> <b><math>\alpha - ^+NH_3</math></b>	<b><math>pK'_R</math></b> <b>R</b>
Glicina	2,34	9,60	
Alanina	2,34	9,69	
Leucina	2,36	9,60	
Serina	2,21	9,15	
Treonina	2,63	10,43	
Glutamina	2,17	9,13	
Ácido aspártico	2,09	9,82	3,86
Ácido glutâmico	2,19	9,67	4,25
Histidina	1,82	9,17	6,0
Cisteína	1,71	10,78	8,33
Tirosina	2,20	9,11	10,07
Lisina	2,18	8,95	10,53
Arginina	2,17	9,04	12,48

O grupo dos aminoácidos não polares compreende os aminoácidos que contêm resíduos alifáticos (alanina, leucina, valina, isoleucina e metionina) e os aromáticos (fenilalanina e triptofano), que têm carácter hidrofóbico. Um dos compostos, a prolina, é peculiar no sentido que seu átomo de hidrogênio forma uma amina secundária e não primária (CONN, 1980).

No segundo grupo estão os aminoácidos com grupos R polares, mas sem carga. A maioria desses aminoácidos possui radicais polares que podem participar na formação de pontes de hidrogênio. Diversos possuem uma hidroxila (serina, treonina e tirosina) ou sulfidril (cisteína), e dois (asparagina e glutamina), têm grupos amídicos. A glicina, não possui grupos R mas está incluída neste grupo devido à sua natureza definitivamente polar, uma propriedade que lhe é conferida pelo fato de seus grupos carregados, amínico e carboxílico, constituírem uma

grande parte da massa da própria molécula. Nesse grupo também estão incluídos os compostos alifáticos e aromáticos (tirosina). (CONN, 1980).

No terceiro grupo estão os aminoácidos com radicais (R) carregados positivamente, também chamados aminoácidos básicos. Três aminoácidos estão incluídos nesse grupo. A lisina, com o seu segundo (épsilon,  $\epsilon$ ) aminogruppo ( $pK'_R = 10,53$ ), estará mais do que 50% na forma carregada positivamente, em qualquer pH abaixo do  $pK_R$  desse grupo. A arginina, que contém um grupo da guanidina fortemente básico ( $pK'_R = 12,48$ ) e a histidina, com seu grupo imidazol fracamente básico ( $pK'_R = 6,0$ ), também fazem parte desse grupo. Uma observação é que a histidina é o único aminoácido que possui um próton que se dissocia no intervalo de pH neutro. E é devido a essa característica que determinados resíduos de histidina exercem um papel importante na atividade catalítica de algumas enzimas (CONN, 1980).

No quarto grupo estão incluídos os aminoácidos com grupos radicais R carregados negativamente, também chamados de aminoácidos ácidos. Esse grupo compreende os dois aminoácidos dicarboxílicos, ácidos aspártico e glutâmico (CONN, 1980).

Quanto às propriedades dos aminoácidos, possuem estrutura iônica que também prevalece no estado cristalino, e poderosas forças de atração atuam entre grupos de cargas opostas. A consequência disso é que os aminoácidos fundem, na maioria das vezes, com decomposição (em torno de  $200^\circ\text{C}$ ). A pressão de vapor dos aminoácidos é, ao mesmo tempo, extremamente baixa devido à interação eletrostática. Pelo mesmo motivo, os aminoácidos são pouco solúveis em solvente não polares. Soluções aquosas de aminoácidos possuem constante dielétrica relativamente alta (DOSE, 1982).

Por apresentarem em sua estrutura um grupo amino e um grupo carboxílico, os aminoácidos apresentam caráter anfótero, ou seja, reagem tanto com ácidos como com bases formando sais orgânicos. (CONN, 1980).

A Figura 1.1 mostra os vinte aminoácidos e suas respectivas cadeias laterais (LEHNINGER, 1984).

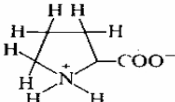
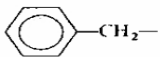
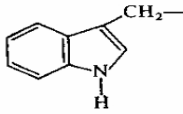
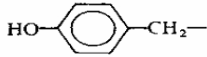
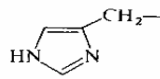
Nome comum	Abrev.	Resto-acila	Cadeia lateral R
<i>Aminoácidos neutros com cadeia lateral não polar</i>			
Glicina	Gly	Glicil-	H-
Alanina	Ala	Alanil-	CH <sub>3</sub> -
Valina	Val	Valil-	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -
Leucina	Leu	Leucil-	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -CH <sub>2</sub> -
Isoleucina	Ile	Isoleucil-	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -CH <sub>2</sub> -CH-   CH <sub>3</sub>
Prolina	Pro	Profil-	
Fenilalanina	Phe	Fenilalanil-	
<i>Aminoácidos neutros com cadeia lateral fracamente polar</i>			
Serina	Ser	Seril-	HO-CH <sub>2</sub> -
Treonina	Thr	Treonil-	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-
Cisteína	Cys, CySH	Cisteil-	HS-CH <sub>2</sub> -
Metionina	Met	Metionil-	CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
Triptofano	Trp	Triptofanil-	
Tirosina	Tir	Tirosil-	
Asparagina	Asn	Asparaginil-	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2- \end{array}$
Glutamina	Gln	Glutaminil-	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$
<i>Aminoácidos ácidos</i>			
Ácido aspártico	Asp	Aspartil-	HOOC-CH <sub>2</sub> -
Ácido glutâmico	Glu	Glutamil-	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
<i>Aminoácidos básicos</i>			
Histidina	His	Histidil-	
Lisina	Lys	Lisil-	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
Arginina	Arg	Arginil-	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ \parallel \\ \text{NH} \end{array}$

FIGURA 1.1 – Classificação dos vinte aminoácidos e suas respectivas cadeias laterais.

O nitrogênio do grupo amino livre, dos aminoácidos presentes nos vegetais, está associado com a rebrota das folhas após o corte feito por animais ruminantes. Resultados de estudos sugerem que essa habilidade de rebrota dos vegetais é altamente dependente do nitrogênio orgânico remobilizado na raiz do vegetal, responsável pela transferência para as folhas novas (LEFEVRE et al., 1991).

Para a identificação das formas de transferência do nitrogênio e para estabelecer mecanismos de controle, é necessário avaliar o conteúdo de aminoácidos livres das diferentes partes da planta, assim como as mudanças que ocorrem após a defoliação.

Com esse objetivo, duas abordagens devem ser tomadas. Primeiramente devem ser realizados estudos voltados à definição da origem do nitrogênio foliar, para estimar o tempo de percurso e o tempo de acumulação durante a rebrota da folha. Segundo, é importante avaliar os efeitos qualitativos e quantitativos do corte, e a composição dos aminoácidos livres da planta durante os primeiros dias de rebrota das folhas (LEFEVRE et al., 1991).

Segundo os resultados obtidos pelos autores, durante os primeiros quatro dias de rebrota, o nitrogênio total das folhas era originado principalmente da remobilização do nitrogênio reduzido solúvel e das proteínas das raízes. Após o sexto dia, o nitrogênio foliar resultante do  $\text{NO}_3$  e do  $\text{NH}_4$  aumentaram progressivamente, e passaram a representar dois terços do nitrogênio total em 14 dias. Durante este tempo não havia nenhum desequilíbrio significativo entre o  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$ , embora houvesse uma pequena preferência para o nitrato (LEFEVRE et al., 1991).

Estes resultados mostram claramente que os aminoácidos exercem um papel fundamental na rebrota adiantada das folhas, através da fração solúvel orgânica do nitrogênio ou da reserva da proteína das raízes (LEFEVRE et al., 1991).

Duas fases podem ser detectadas em mudanças dos aminoácidos livres durante a rebrota da folha. No primeiro dia, os níveis de alguns aminoácidos principais caíram (ácido glutâmico e serina), enquanto outros claramente aumentaram (prolina, treonina, asparagina e glutamina). Após o primeiro dia, o ácido glutâmico e a serina das folhas foram restaurados progressivamente. Entretanto, os níveis de glutamina, prolina e asparagina diminuíram (LEFEVRE et al., 1991).

A partir do descrito nos parágrafos anteriores, é possível avaliar a relevância de serem devidamente avaliadas a quantidade de aminoácidos totais presente na amostra vegetal.



Sendo assim, neste trabalho é proposta a construção de um sistema de multicomutação, o qual será aplicado para determinação de aminoácidos totais em amostras vegetais.

## *REVISÃO DE LITERATURA*

---

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Extração de aminoácidos

Dentre os diferentes métodos para extração de aminoácidos, destaca-se a extração com etanol 80% (v/v) e clorofórmio. Esse método consiste em triturar o material vegetal na presença de etanol e posterior extração com clorofórmio (PASSOS, 1996).

Outro método, descrito por WINTERS, et al., (2002), consiste na extração de aminoácidos de amostras vegetais utilizando somente água destilada a 95°C.

### 2.2 Determinação de aminoácidos

Existem vários métodos para a determinação de aminoácidos, sendo que uma das maneiras para se determinar cada aminoácido separadamente, é com o emprego da cromatografia de troca-iônica, explorando assim o seu comportamento ácido-base para a quantificação (LEHNINGER, 1984).

Um método alternativo para a determinação de aminoácidos totais, foi proposto por SPACKAM, et al., (1958). Esse método consiste na reação colorimétrica entre os grupos funcionais amino e carboxila dos aminoácidos com o reagente ninidrina ( $C_9H_6O_4$ ). Nessa reação, o aminogruppo dos aminoácidos, sofre oxidação por um agente oxidante mais fraco, a ninidrina, formando amônia,  $CO_2$  e aldeído (RCOH), obtido pela perda de um átomo de carbono do aminoácido original. Nessa reação, um equivalente da ninidrina serve como oxidante do aminoácido, formando uma ninidrina na forma reduzida. Um segundo equivalente da ninidrina oxidada reage então com a ninidrina reduzida e com a amônia formada, para formar um complexo roxo, o qual vai ser detectado através de um espectrofotômetro VIS no comprimento de onda de 570 nm. (Figura 2.1) (CONN, 1980).

MOORE (1954), usou o reagente ninidrina para determinação de aminoácidos totais e compostos relacionados. LEE (1966) usou o glicerol para improvisar a determinação de aminoácidos substituindo a ninidrina. SODEK (1978), adaptou a determinação de aminoácidos usando o ácido trinitrobenzenosulfônico, em análise

por injeção em fluxo. IBOLYA e MARGIT (1989), estudou interação do triptofano, lisosina e tirosina com ninidrina em solução fortemente ácida. VAN STANDEN e McCOMARCK (1998), desenvolveu um sistema de injeção seqüencial para determinação de aminoácidos com o ácido 2,4,6 trinitrobenzosulfônico. Neste método, o produto da reação apresenta uma coloração amarela com absorvância máxima em 350 nm. Esse sistema apresentou uma faixa linear de trabalho entre 0 e  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , com freqüência analítica de 15 determinações por hora e um desvio padrão relativo inferior a 2,3%. COSTIN, et al., (2003), determinou aminoácidos, usando análise por injeção em fluxo fazendo a detecção por quimiluminescência. Neste trabalho foi realizada a determinação de aminoácidos de forma seletiva, sendo eles: prolina, histidina, tirosina, arginina, fenilalanina e o triptofano. Para obter essa separação o autor utilizou uma coluna cromatográfica preenchida com C18. O desvio padrão relativo para cada método foi inferior a 3,9% para cinco replicatas, com padrão  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e limites de detecção entre  $4 \times 10^{-9}$  e  $7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

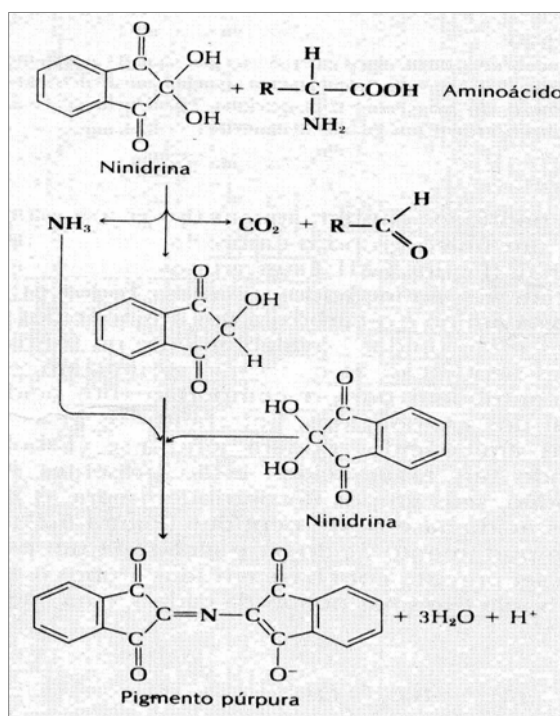


Figura 2.1- Reação entre aminoácidos e ninidrina.

## 2.3 Análise em Fluxo

A análise por injeção em fluxo consiste em um processo de mecanização de procedimentos analíticos, no qual a amostra na forma de solução é introduzida em um fluido transportador e levada em direção ao detector. Durante o transporte, a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração, etc. (REIS et al., 1989) (Figura 2.2). Na proposta inicial do sistema por injeção em fluxo, a inserção da amostra no percurso analítico era efetuada através de uma seringa hipodérmica (RUZICKA e HANSEN, 1975). Devido a isso, a precisão dependia diretamente do operador, em virtude das variações na seleção da amostra e na alteração da vazão na etapa da inserção. Esse problema foi solucionado pelo uso de injetores proporcionais (BERGAMIN et al., 1978) e válvulas rotatórias (MURACKI et al., 1992). Nesses sistemas, a amostragem e a inserção da amostra são realizadas em dois estágios, utilizando um injetor ou válvula que operam de forma manual, limitando de certa forma a versatilidade do sistema. Visando maior independência do operador, foi proposto o uso de válvulas solenóides de três vias (PASQUINI e FARIA, 1991), que oferecem a vantagem de acionamento discreto, individual, de forma automatizada. Posteriormente, seu emprego deu origem ao conceito de multicomutação e amostragem binária (REIS et al., 1994), que permitem o emprego de menores volumes de reagentes, sendo a inserção da amostra e dos reagentes feita utilizando as válvulas solenóides de três vias, e em alguns casos utilizando apenas um canal de bombeamento. Além disso, uma pequena alteração no programa de controle e uma variação na seqüência de acionamento das válvulas solenóides permitem que mudanças sejam efetuadas sem alterar a estrutura física do módulo de análise. O sistema de multicomutação é caracterizado pela sua alta versatilidade e por se aplicar em diversos sistemas em fluxo com diferentes configurações. Essa técnica proporcionou o desenvolvimento de sistemas mais simples, versáteis e miniaturizados em comparação com os sistemas em fluxo utilizados. Além disso, os sistemas de multicomutação disponibilizam uma seleção aleatória dos reagentes, uma automatização completa, e uma expansão da escala analítica, das aplicações e das crescentes potencialidades das metodologias já existentes (ZAGATTO, et al., 1999).

O sistema de multicomutação teve sua aplicação evidenciada em diferentes métodos analíticos. Como exemplo, tem sido amplamente empregado em sistemas

onde se torna necessária a diluição controlada, ou em determinações seqüenciais, assim como para aumentar o tempo de residência nas leituras, ou para separação ou concentração em linha, entre outras aplicações (ROCHA, et al., 2002). Como os demais sistemas em fluxo, sua aplicação tem sido ampla na determinação de vários analitos empregando diferentes detectores. Como exemplo, ICARDO, et al. (2001) utilizaram a técnica de multicomutação para determinação de cloreto por difusão gasosa com detecção espectrofotométrica a 445 nm. VIEIRA, et al. (2001), construíram um sistema em fluxo usando a gravidade para determinação turbidimétrica de sulfato. ROCHA, et al. (2003), utilizaram a técnica de multicomutação para determinação de vitaminas em preparos farmacêuticos. TUMANG, et al. (2001), propuseram um sistema em fluxo usando multicomutação para determinação espectrofotométrica de L (+) lactato em silagem, explorando reação enzimática.

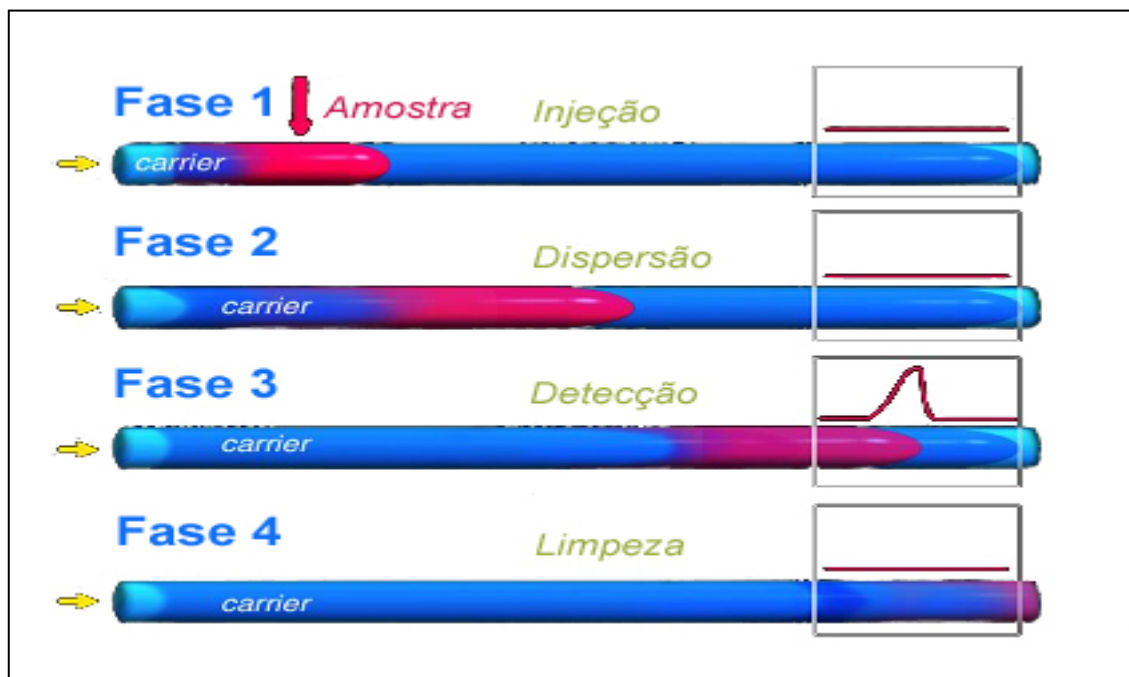


Figura 2.2: Análise por injeção em fluxo.  
(Modificado da [www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com))

## 2.4 Planejamento Fatorial

A obtenção do sinal analítico nos sistemas em fluxo ou multicomutação é diretamente dependente de vários fatores. Como exemplo tipo, velocidade, e estequiometria da reação, além da maneira como esta será utilizada. Com isso,

torna-se necessário uma otimização das condições de operação do sistema a ser empregado. Nesse enfoque, planejamentos experimentais têm sido cada vez mais utilizados para a otimização dos sistemas. Um planejamento experimental adequado consiste na projeção de experimentos, os quais sejam capazes de fornecer a informação de interesse. Devem ser definidas as variáveis do sistema e o tipo de resposta a ser obtida. Sendo definidos esses parâmetros, testes serão realizados alterando as condições do sistema, para que a resposta de interesse seja analisada (BARROS NETO, et al., 1995).

As variáveis do sistema são definidas por um planejamento fatorial, que é o método usado para selecionar as variáveis que apresentam influência na resposta obtida no sistema proposto, se comportam de forma independente ou associada, e se essa influência será negativa ou positiva (BARROS NETO, et al., 1995).

O número de experimentos a ser realizado em cada planejamento fatorial depende do valor, e dos níveis máximo e mínimo de cada variável. Para construir um planejamento fatorial, primeiro é necessário estipular os níveis máximo e mínimo de cada variável que serão empregados nos experimentos (BARROS NETO, et al., 1995).

O efeito principal de uma variável no sistema é calculado pela diferença entre a resposta média obtida quando uma determinada variável foi estudada em seu nível superior e a resposta média, em relação à mesma variável em seu nível inferior. O efeito de interação entre as variáveis é calculado pela diferença entre a resposta média obtida quando os níveis estudados foram alternados para cada uma das variáveis (BARROS NETO, et al., 1995).

## 2.5 Condições da reação analítica

Nos estudos realizados para determinação de aminoácidos totais, utilizou-se a reação entre aminoácidos e ninidrina, para a formação de um complexo colorimétrico denominado “Ruhemann’s purple”. Nesta reação  $\alpha$ -aminoácidos reagem com a ninidrina, sendo necessárias duas moléculas de ninidrina para cada molécula de aminoácido para formar o complexo colorido. Essa reação envolve o deslocamento de uma espécie nucleofílica de um grupo OH da ninidrina, por um grupo amino não-protonado. (Figura 2.3) (FRIEDMAN, 2004).

Parâmetros polares e estéricos estão envolvidos durante o deslocamento nucleofílico do grupo OH da ninidrina por um grupo  $\text{NH}_2$  na primeira etapa da reação. Resultados são consistentes com o propósito de que a primeira etapa da reação é a etapa determinante. Os produtos da reação de aminoácidos com ninidrina são  $\text{CO}_2$ , aldeído (RCHO) e o complexo colorido denominado “Ruhemann’s purple” (RP). (FRIEDMAN, 2004).

Em alguns casos, o complexo RP não corresponde ao esperado equivalente estequiométrico por grupo amino. Possíveis razões para esse comportamento não-ideal incluem formação lenta, aspectos reacionais, instabilidade hidrolítica, oxidativa e fotolítica e cor interferente. Estudos mostram a contribuição de dois desses fatores: (FRIEDMAN, 2004).

a) Reação lenta: Alguns agrupamentos amino reagem com a ninidrina mais lentamente que outros, resultando um produto de coloração fraca em um determinado tempo de reação, podendo ser determinado, apesar de se tratar de uma reação incompleta, principalmente se for empregado sistemas em fluxo. De qualquer modo, medindo a formação da cor em vários intervalos de tempo é possível a obtenção do valor máximo.

b) Equilíbrio desfavorável: Desde que a reação tem várias etapas, essa reação apresenta vários pontos nos quais a amina pode ser convertida para a formação do RP. A descarboxilação (perda de  $\text{CO}_2$ ) e a formação de aldeído são essencialmente irreversíveis. Assim, qualquer equilíbrio anterior a essa última etapa (formação de aldeído), pode somente reduzir a velocidade da reação.

Alternativamente, a hidrólise de catálise ácida do RP em baixos valores de pH torna relativamente rápido o tempo da reação (Figura 2.4). O equilíbrio é alterado por um aumento do pH e remoção da  $\text{NH}_3$ . Essa reação requer redução em alguns passos, e tudo indica que o próprio excesso de ninidrina atue como agente redutor. Um procedimento proposto por TAHBOUB e PARDUE (1985), empregou diferentes tipos de aminoácidos, usando o método da ninidrina, e avaliou a absorvância obtida em função do tempo de reação. O intervalo de tempo avaliado foi entre 8 e 358 segundos. Além do tempo de reação, neste trabalho também foram avaliados o efeito do pH, o efeito da temperatura e o efeito da concentração da ninidrina na absorvância obtida. Os resultados mostraram que as melhores condições de trabalho para o método proposto foram obtidas utilizando um valor de pH de 5,4, concentração da ninidrina de  $0,165 \text{ mol L}^{-1}$  e tempo de reação entre 60 e 120 s, além



de temperatura de aproximadamente 80°C. Entre os diferentes padrões de aminoácidos avaliados estão a glicina e a leucina.

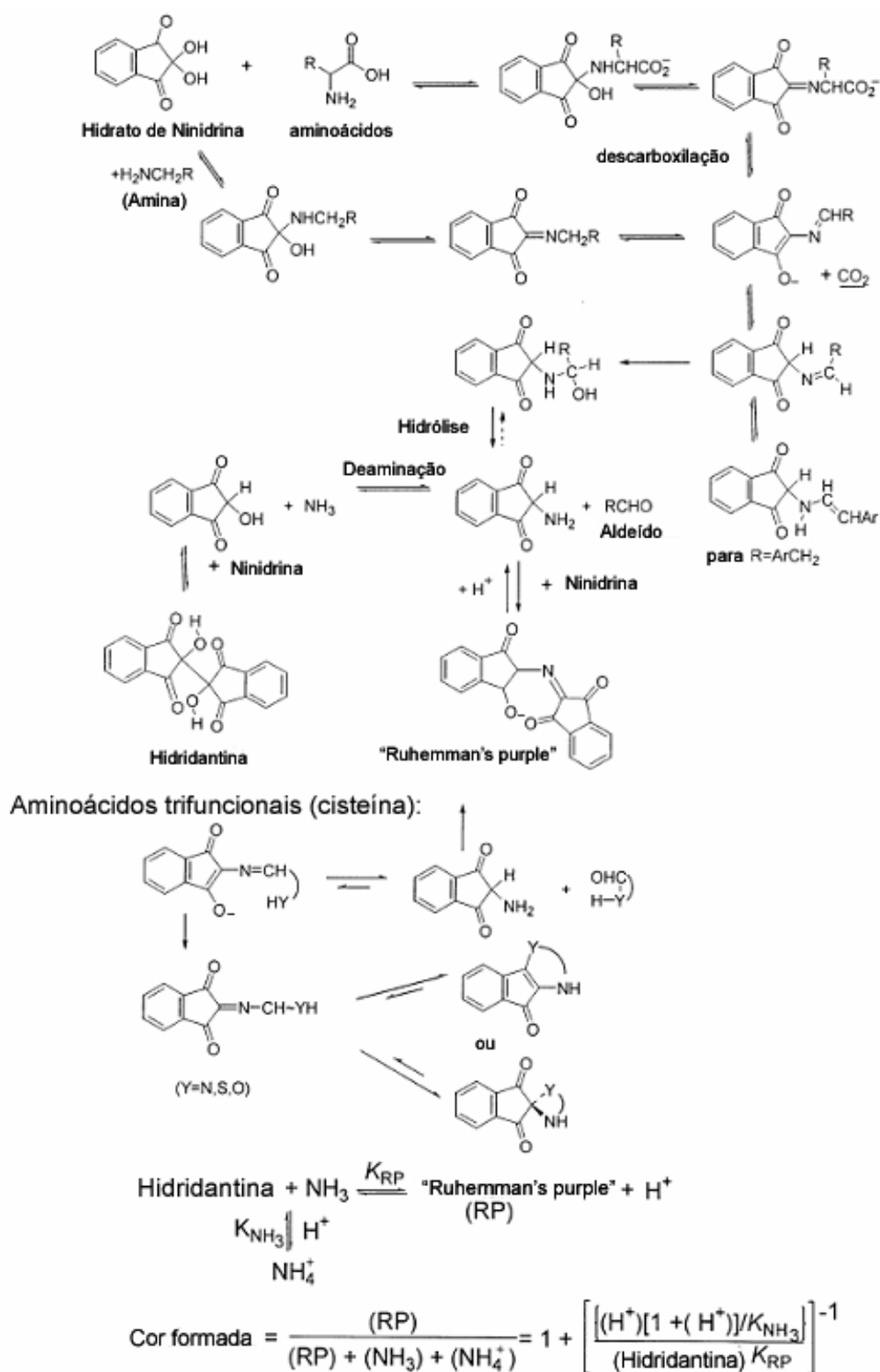


Figura 2.3 – Mecanismo da reação entre  $\alpha$ -aminoácidos e ninidrina para formar o Ruhemann's Purple e outros produtos (FRIEDMAN, 2004).

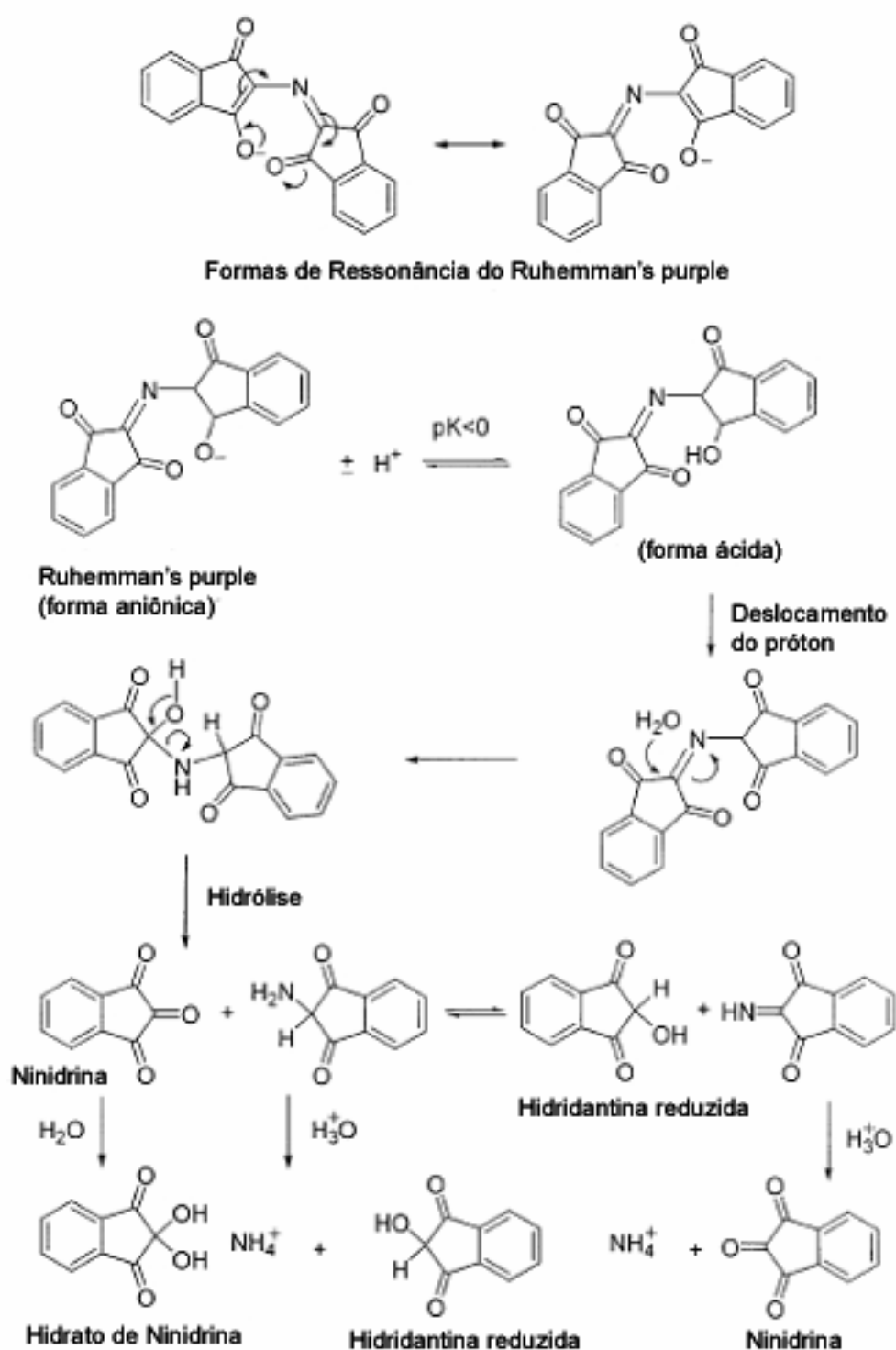


Figura 2.4 – Esquema representando o elétron delocalizado e o mecanismo de hidrólise para formação do Ruhemann's Purple em solução ácida (FRIEDMAN, 2004).

## *MATERIAL E MÉTODOS*

---

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Soluções

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas empregando-se reagentes de pureza analítica. A água utilizada como solvente foi previamente destilada, desionizada e purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> até resistividade 18 MΩ cm.

Para realização da limpeza de todo o material utilizado nos experimentos foi utilizada água destilada e deionizada, além de banho de 10% v/v, em ácido nítrico durante 24 horas, para descontaminação.

Os reagentes ninidrina, sulfato cúprico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec, hidróxido de amônio, etileno glicol monometil éter, cloreto férrico e ácido clorídrico foram adquiridos da Synth, o ácido acético foi adquirido da Merck, e o reagente 4-aminoantipirina foi adquirido da ICN Biomedicals.

#### Soluções Estoque de Aminoácidos

a) Solução estoque de cisteína 0,1 mol L<sup>-1</sup>:

Foram pesados 1,210 g de cisteína, adquirida em farmácia de manipulação, (Deg Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo). Dissolvidos, usando HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

b) Solução estoque de leucina 0,1 mol L<sup>-1</sup>:

Foram pesados 1,310 g de leucina, adquirida em farmácia de manipulação, (Deg Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo). Dissolvidos com solução HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

c) Solução estoque de cistina 0,1 mol L<sup>-1</sup>:

Foram pesados 2,400 g de cistina, adquirida em farmácia de manipulação, (Deg Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo), que foram dissolvidos em solução HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

d) Solução estoque de arginina  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ :

Foram pesados 1,740 g de arginina, adquirida em farmácia de manipulação, (Deg Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo), que foram dissolvidos em solução HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

e) Solução estoque de glicina  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ :

Foram pesados 0,750 g de glicina, adquirida em farmácia de manipulação, (Deg Importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo), que foram dissolvidos em solução HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

f) Solução de referência para obtenção das curvas de calibração para avaliação do sistema de multicomutação.

Todos os padrões utilizados no preparo das soluções descritas anteriormente, apresentaram valores de pureza dentro das especificações do fabricante, sendo, acima de 99,8% de pureza para todos os padrões utilizados.

As curvas analíticas foram preparadas a partir das diluições das soluções estoque dos aminoácidos.

### 3.1.1 Solução tampão

A solução tampão acetato de sódio com pH entre 5,3 e 5,4, foi preparada a partir de uma solução de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , e uma solução de ácido acético  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Adicionou-se 5 mL de hidróxido de sódio e 6 mL de ácido acético para um volume final de 50 mL. O valor do pH foi ajustado com a solução de NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.1.2 Solução de Ninidrina

A solução de ninidrina  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada dissolvendo, em béquer de 10 mL, 1,786 g de ninidrina em 2-metoxietanol (etilenoglicol-monometiléter). A seguir, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com 2-metoxietanol.

## 3.2 Instrumentação

### 3.2.1 Método

O método para determinação de aminoácidos totais em amostras vegetais, baseou-se na reação entre os grupos funcionais amino e carboxila dos aminoácidos com a ninidrina. Nessa reação, o nitrogênio do grupo amino reage com duas moléculas da ninidrina formando um complexo roxo chamado de “Ruhemann’s purple”, o qual pode ser detectado no comprimento de onda de 570 nm (LEHNINGER, 1984).

### 3.2.2 Equipamentos e acessórios

O sistema de multicomutação utilizado para determinação de aminoácidos totais, presentes em amostras vegetais empregou 5 válvulas solenóides de três vias Nresearch Incorporated, modelo 161T031 (Figura 3.1), uma bomba peristáltica com canal único e rotação variável (Gilson), equipada com tubo de Viton<sup>®</sup> (d.i.=2,79 mm), para aspiração das soluções e tubos de polietileno de 0,8 mm d.i., para construção do percurso analítico, incluindo neste, uma bobina de mistura medindo 150 cm (Figura 3.1).

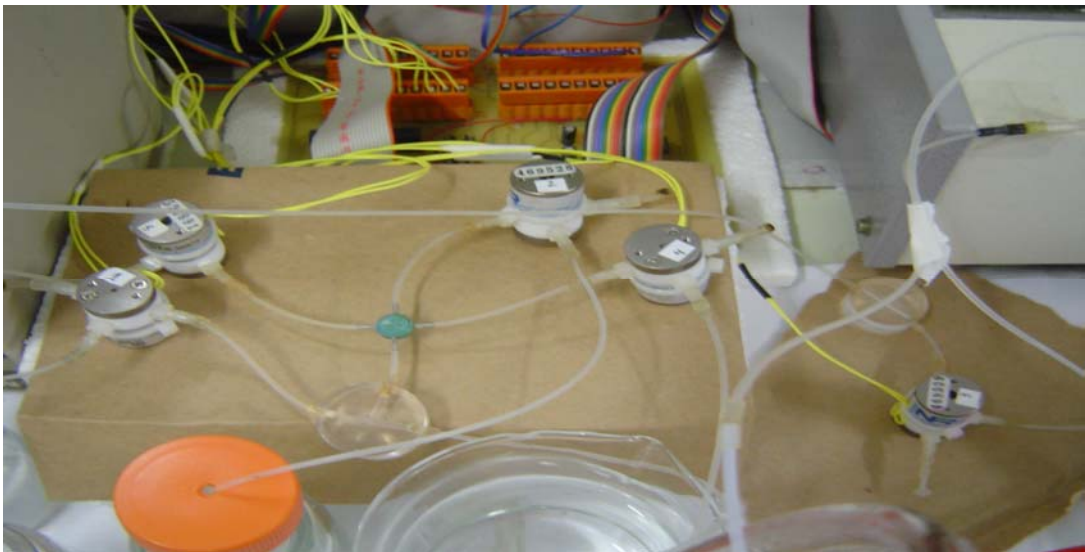


Figura 3.1 – Válvulas solenóides de três vias utilizadas no sistema para adição das soluções no percurso analítico.

A Figura 3.2 ilustra o sistema utilizado, sendo BP, bomba peristáltica (Gilson® mod. Miniplus 3); manta aquecedora Fisatom, microcomputador com interface eletrônica (Advantech, PCL 711S) utilizada para controlar as válvulas solenóides, a bomba peristáltica e o registro dos sinais; Det., detector (espectrofotômetro modelo 432 FEMTO) com cela de fluxo com caminho óptico de 1 cm,  $\lambda = 570$  nm; e direcionamento da coleta para futuro tratamento. O sistema foi controlado por um programa de controle desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária dentro do programa MultSwitch utilizando plataforma Labview. A operação deste programa permite o controle de todo o sistema de multicomutação, incluindo a velocidade de rotação da bomba peristáltica, a abertura e fechamento das válvulas solenóides, o tempo de ocorrência de cada passo, além da aquisição dos dados (Figura 3.3).

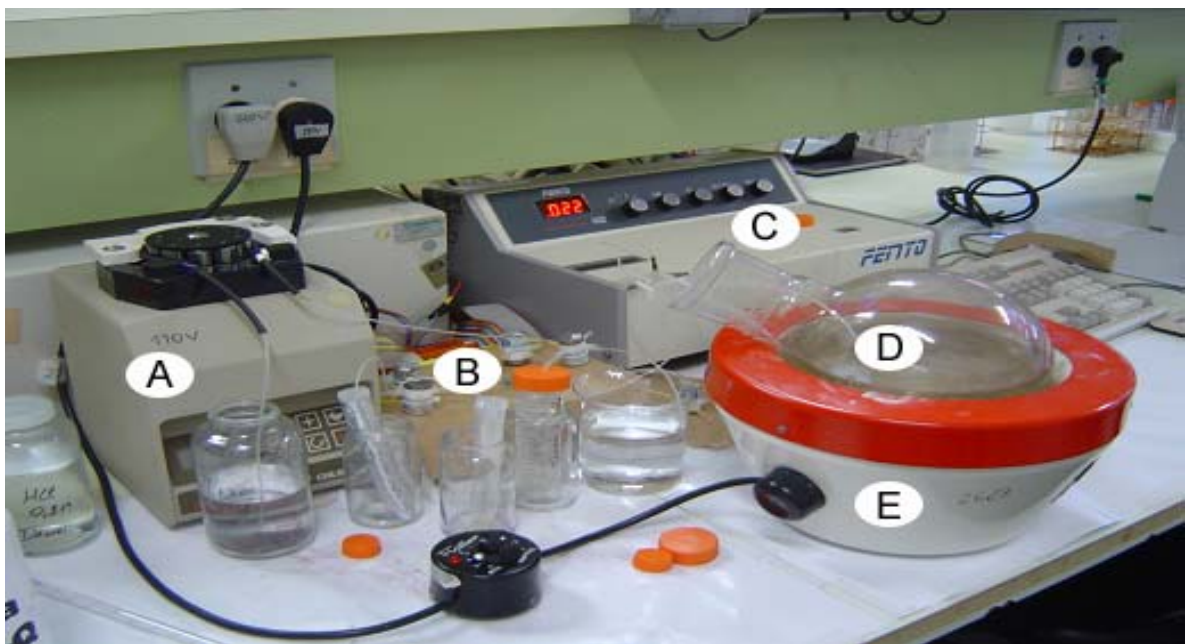


Figura 3.2 - Foto do sistema utilizado, sendo: A - bomba peristáltica; B - válvulas solenóides; C - espectrofotômetro VIS; D - bobina de reação; E - manta aquecedora.

Na realização do teste de interferentes, foi utilizado para a determinação da concentração de metais presentes nas amostras um (ICP OES) espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, marca Varian mod. Vista RL. Para o preparo das amostras, foi utilizado liofilizador (EC Apparatus mod.

MicroModulyo), seguido da moagem em moinho criogênico (SPEX CertiPrep mod. 6750).

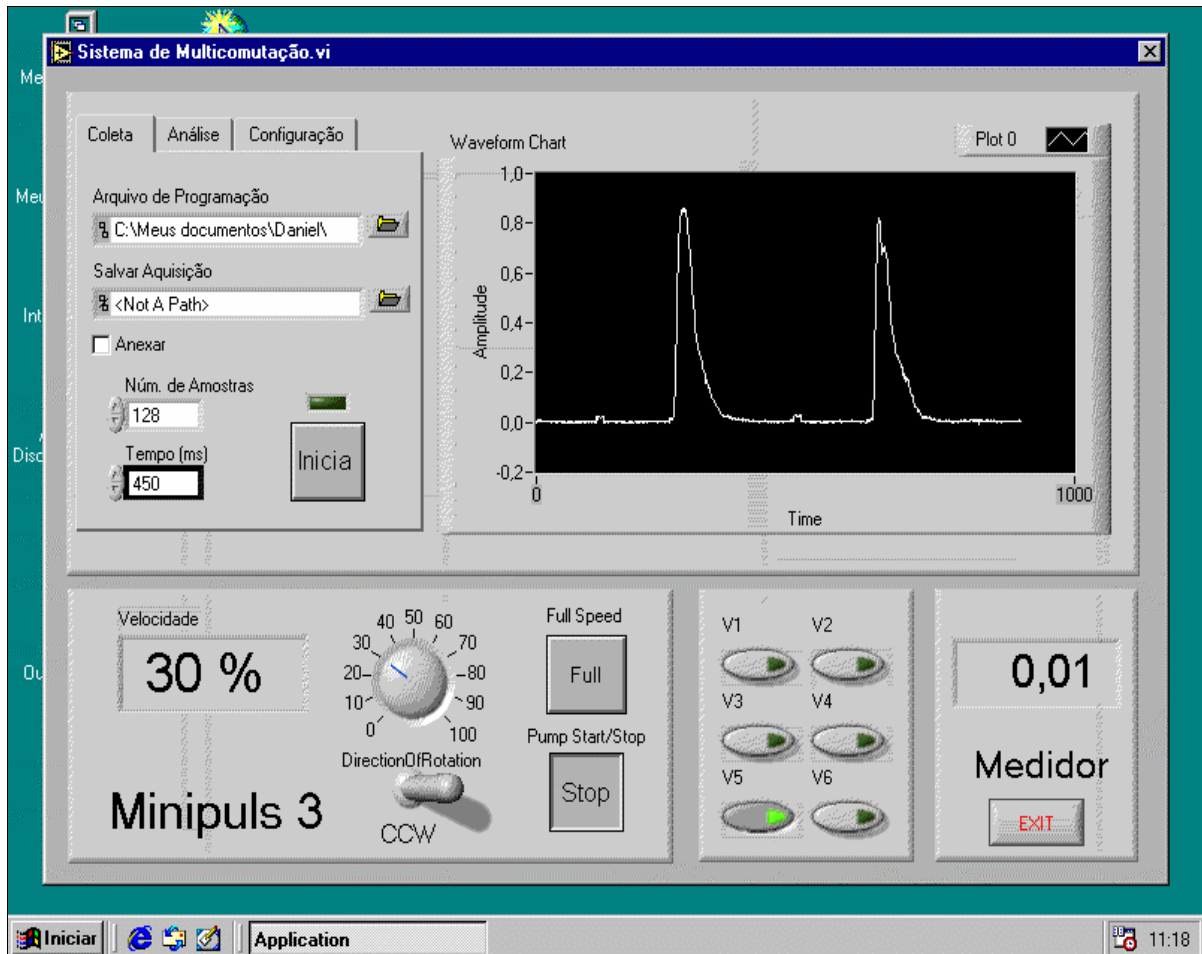


Figura 3.3 - Tela do programa MultSwitch utilizado no sistema de multicomutação para o controle do processo analítico.

### 3.2.3 Descrição do Programa de Execução

No diagrama de blocos na FIGURA 3.4, está representado a operação do programa proposto.



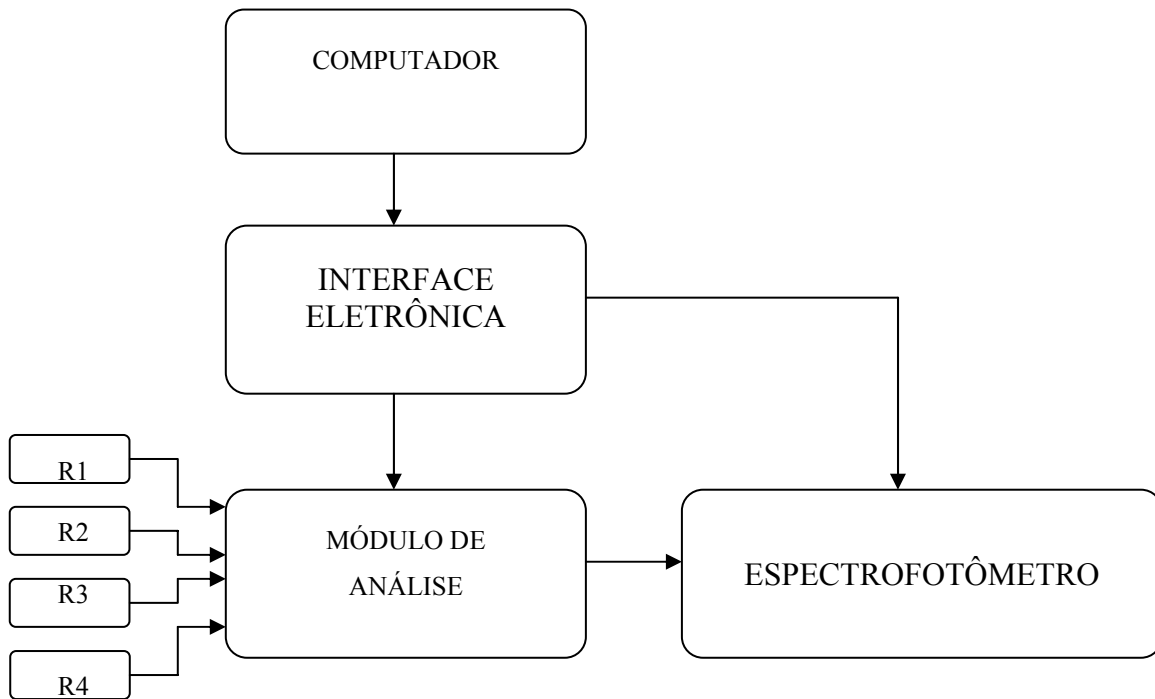


FIGURA 3.4 – Diagrama de blocos representando a operação do programa proposto.

Na execução do programa são solicitadas ao usuário as seguintes variáveis: duração do intervalo de tempo de acionamento das válvulas solenóides, seqüência de acionamento das válvulas solenóides, velocidade de rotação da bomba peristáltica, duração do intervalo de parada de fluxo no reator de mistura, tempo de leitura e número de repetições. Efetuada essa etapa de configuração dos dados, o microcomputador assume o controle do processo analítico (Figura 3.3).

A configuração dos dados do programa de execução é realizada através do ícone Arquivo de Programação, o qual se encontra na tela principal. Neste arquivo de programação, é então criado um programa onde estão dispostas as etapas de execução para a leitura do sinal transiente. Para a construção do arquivo é necessário definir quais serão as etapas a serem seguidas. Cada linha do programa representa uma etapa, no qual deve ser definida a válvula solenóide que

permanecerá aberta ou fechada, velocidade de rotação da bomba peristáltica com seu sentido de rotação e para finalizar, o tempo de duração da respectiva etapa. No final da programação é necessário criar uma etapa de forma que o programa encerre seu ciclo, com todas as válvulas na posição fechada seguido do termo END.

A definição de quais válvulas permanecerão fechadas ou abertas durante cada etapa é feita pelo código binário, utilizando numeraração 0 e 1, fechada e aberta, respectivamente. A velocidade de rotação da bomba peristáltica é descrita em termos de porcentagem de rotação, a qual representa uma porcentagem do valor ajustado na própria bomba peristáltica. Cada etapa é então definida pela seqüência de abertura das válvulas solenóides, seguido da velocidade de rotação da bomba peristáltica, o sentido de rotação e, por fim, o tempo de acionamento para as respectivas válvulas desta etapa. O programa de execução criado para realização da determinação de aminoácidos totais está representado na Tabela 3.1, onde o sentido de rotação referente à aspiração das soluções é representado pela sigla CCW (anti-horário). Para criar o programa de execução é necessário representar as seis válvulas solenóides existentes no programa (Figura 3.3), independentemente de todas elas serem utilizadas. No sistema, foram utilizadas cinco válvulas solenóides, com isso, a sexta válvula permaneceu desligada.

Tabela 3.1 – Programa de execução usado para determinação de aminoácidos totais.

<b>Válvulas</b>	<b>Velocidade (%)</b>	<b>Sentido</b>	<b>Tempo (s)</b>
1,0,0,0,0,0	40	CCW	2
0,1,0,0,0,0	40	CCW	7
0,0,1,0,0,0	40	CCW	3
0,0,0,1,0,0	40	CCW	3
1,0,0,0,0,0	40	CCW	5
1,0,0,0,0,0	0	CCW	150
1,0,0,0,0,0	80	CCW	7
1,0,0,0,1,0	80	CCW	5
1,0,0,0,0,0	40	CCW	15
1,0,0,0,0,0	100	CCW	45
0,0,0,0,0,0	0	CCW	0
END			

### 3.2.4 Funcionamento do módulo de análise e estudo das variáveis do sistema.

O funcionamento do módulo de análise proposto está representado na Figura 3.5.

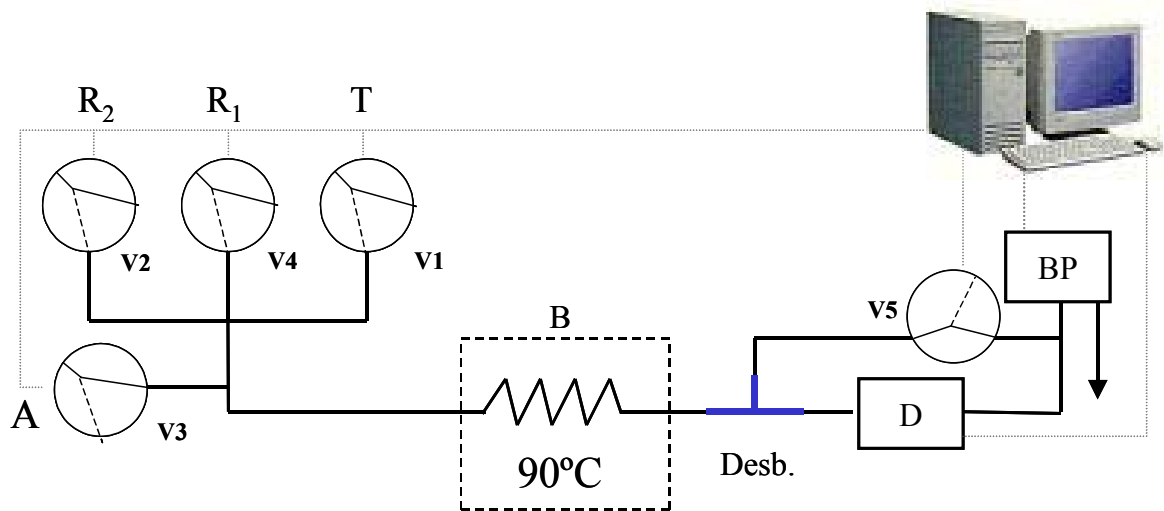


FIGURA 3.5 – Sistema de multicomutação proposto para determinação de aminoácidos totais. **A**, amostra; **T**, solução transportadora; **R1**, reagente 1 (tampão acetato-sódio); **R2**, reagente 2 (solução de ninidrina); **D**, detector; **BP**, bomba peristáltica **B**, Bobina de reação; **V1 a V5**, válvulas solenóides.

No sistema, a solução transportadora (H<sub>2</sub>O) é introduzida inicialmente no sistema. Em seguida, é feita a aspiração da solução de ninidrina, seguido da aspiração da amostra e da solução tampão acetato-sódio, que são direcionadas à bobina de reação (150 cm). Nesta etapa, o fluxo é parado na bobina de reação, imersa em um banho aquecido a 90°C. O aquecimento da mistura é indispensável para que ocorra a reação. Devido à alta temperatura, o sistema apresenta formação de bolhas, as quais interferem na leitura do sinal transiente dentro da cela de fluxo no detector. Portanto, foi necessário o uso de um desborbulhador para solucionar o problema (Figura 3.6). Após a parada de fluxo na bobina de reação, a mistura é então aspirada em direção ao desborbulhador, para eliminar as bolhas através do desborbulhador, e logo em seguida, permanecendo a mesma vazão, a válvula 5 é

fechada durante essa etapa, para garantir que todo o produto da reação passe pelo desborbulhador e siga em direção ao detector levado pela solução transportadora. Logo após é realizada a leitura do sinal transiente. Após essa etapa, a válvula 1 permanece aberta, levando a solução transportadora para que seja efetuada a limpeza do percurso analítico e da cela de fluxo. O programa de acionamento das válvulas solenóides e da bomba peristáltica com os respectivos tempos e vazões, é apresentado na Tabela 3.2 e está dividido em 10 etapas:

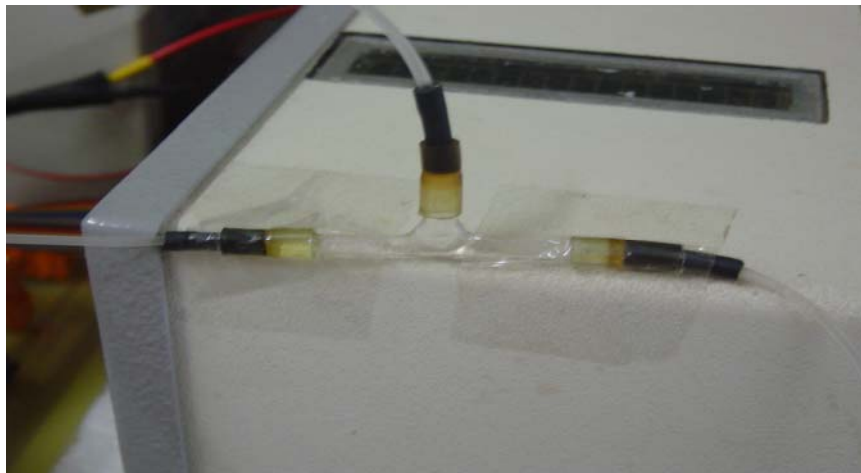


Figura 3.6 – Foto do desborbulhador usado no sistema de multicomutação

Etapa 1: a válvula 1 está aberta e a bomba peristáltica é acionada para efetuar a aspiração da solução transportadora ( $\text{H}_2\text{O}$ ), com vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 2 s.

Etapa 2: a válvula 2 é aberta e a solução de ninidrina é aspirada com vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 7 s.

Etapa 3: a válvula 3 é aberta e a amostra é aspirada durante 3 s, com vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Etapa 4: a válvula 4 é aberta e então a solução tampão acetato de sódio é aspirada durante 3 s, com vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Etapa 5: a válvula 1 é aberta e a solução transportadora é aspirada durante 5 s, com vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$  para que a mistura reacional alcance a bobina de reação.

Etapa 6: Parada de fluxo dentro da bobina de mistura (150 s com temperatura de  $90^\circ\text{C}$ ).

Etapa 7: a válvula 1 é aberta e o sistema aspira a solução transportadora com vazão de  $5,6 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 7 s, para que o produto da reação alcance o desborbulhador.

Etapa 8: a válvula 1 permanece aberta com a mesma vazão da etapa anterior, sendo acionada simultaneamente a válvula 5 para a posição fechada, fazendo com que todo o produto reacional seja direcionado ao detector. Essa etapa tem duração de 5 s.

Etapa 9: a válvula 1 permanece aberta, sendo acionada durante 15 s, a uma vazão de  $3,1 \text{ mL min}^{-1}$ . Nesta etapa a mistura passa pelo detector, sendo realizada a leitura do sinal transiente em 570 nm.

Etapa 10: a válvula 1 está aberta, sendo a solução transportadora ( $\text{H}_2\text{O}$ ), aspirada durante 45 s a vazão máxima ( $6,6 \text{ mL min}^{-1}$ ). Nesta etapa é realizada a limpeza do percurso analítico e da cela de fluxo.

Tabela 3.2 - Seqüência de acionamento das válvulas solenóides e da bomba peristáltica.

ETAPA	VÁLVULA	SOLUÇÃO	VAZÃO ( $\text{mL min}^{-1}$ )	TEMPO (s)
1	1	$\text{H}_2\text{O}$	3,1	2
2	2	Ninidrina	3,1	7
3	3	Amostra	3,1	3
4	4	Tampão	3,1	3
5	1	$\text{H}_2\text{O}$	3,1	5
6	1	$\text{H}_2\text{O}$	0	150
7	1	$\text{H}_2\text{O}$	5,6	7
8	1 e 5	$\text{H}_2\text{O}$	5,6	5
9	1	$\text{H}_2\text{O}$	3,1	15
10	1	$\text{H}_2\text{O}$	6,6	45

A seqüência de acionamento das válvulas solenóides descrita na Tabela 3.2, está representada no diagrama de tempo (Figura 3.7), onde as etapas do programa estão representadas em blocos em função do tempo e da seqüência de acionamento.

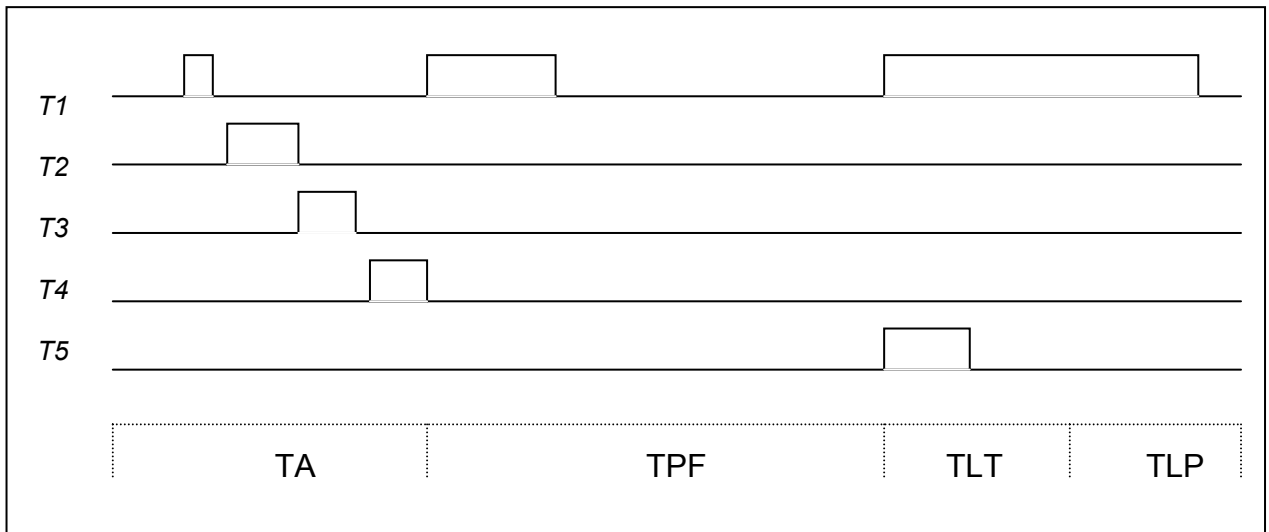


FIGURA 3.7 – Diagrama de tempo de acionamento para as respectivas válvulas V1 a V5. TA – Tempo de Amostragem das soluções, TPF – Tempo de Parada de Fluxo, TLT – Tempo de Leitura do Sinal Transiente e TLP – Tempo de Limpeza do Percurso Analítico.

Por se tratar de um sistema em linha única, foi criado um programa para realizar a limpeza da alça de amostragem. Após o ciclo completo do programa de execução, o sistema é então desligado automaticamente e com isso o operador deve selecionar o programa de limpeza da alça de amostragem, sendo feita à troca das soluções na válvula referente à amostra ou solução padrão. O programa de limpeza da alça de amostragem é descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Programa usado para limpeza da alça de amostragem.

<b>Válvulas</b>	<b>Velocidade (%)</b>	<b>Sentido</b>	<b>Tempo (s)</b>
1,0,0,0,0,0	100	CCW	5
0,0,1,0,0,0	50	CCW	8
1,0,0,0,0,0	100	CCW	10

### 3.2.5 Planejamento Experimental

As variáveis que influenciam diretamente no sinal analítico, como volume da amostra, volume da ninidrina e concentração do reagente, tempo de parada e tamanho da bobina de reação, foram otimizados simultaneamente, utilizando a metodologia do planejamento fatorial (BARROS NETO et al., 1995).

Os níveis para os parâmetros otimizados foram variados conforme descrito na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Variáveis estudadas com seus níveis baixo e alto para o planejamento fatorial  $2^5$ .

<b>Variável</b>	<b>Nível Baixo (-)</b>	<b>Nível Alto (+)</b>
Concentração ninidrina	0,16 mol L <sup>-1</sup>	0,5 mol L <sup>-1</sup>
Volume ninidrina	100 µL	260 µL
Volume amostra	50 µL	260 µL
Tempo de parada na bobina de reação	15 s	30 s
Tamanho da bobina de reação	25 cm	75 cm

Para o cálculo do efeito de interações entre as variáveis, foi utilizado um programa computacional de domínio público, denominado fatorial (parte integrante de BARROS NETO et al., 1995).

Em função dos resultados obtidos com o planejamento fatorial  $2^5$ , o experimento foi refeito empregando um planejamento  $2^3$  + estrela cujo planejamento está descrito na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Variáveis estudadas em seus níveis baixo e alto para o planejamento fatorial  $2^3 +$  estrela.

<b>Variável</b>	<b>Nível Baixo (-)</b>	<b>Nível Alto (+)</b>
Volume Amostra	200 $\mu\text{L}$	410 $\mu\text{L}$
Volume Ninidrina	200 $\mu\text{L}$	410 $\mu\text{L}$
Tempo Parada Fluxo	20 s	40 s

### 3.3 Teste de Interferentes

Segundo WINTERS et al, (2002), a amônia apresenta uma resposta ao método da ninidrina. Desta forma, tornou-se necessária a avaliação do teor médio de amônia presente nas amostras.

Para a determinação de amônia, foi preparada uma solução de hidróxido de sódio  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  com 2% de EDTA.

Nessa reação o NaOH reage com o  $\text{NH}_4^+$ , aumentando dessa forma o pH e formando amônia. O EDTA utilizado serve como complexante dos metais presentes na solução, garantindo dessa forma que se obtenha somente a amônia para leitura.

Nesse sistema a amônia presente na amostra é separada através de uma câmara de difusão gasosa e direcionada para o detector, sendo a detecção realizada através da diferença de condutividade. (Figura 3.8).



A determinação de amônia nas amostras foi baseada em um sistema utilizado na EMBRAPA Pecuária Sudeste, com modificações da proposta original por LEMOS et al, (2002).

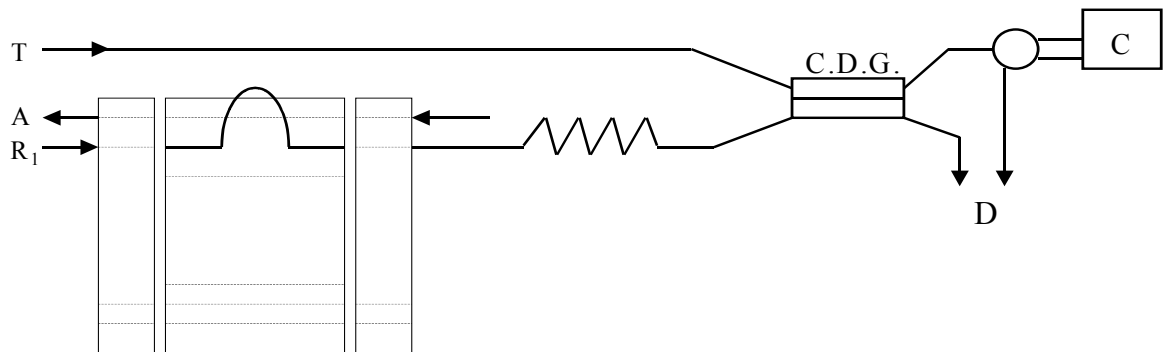


Figura 3.8 – Sistema em fluxo utilizado para determinação de amônia nas amostras. **A** – Amostra; **R1** – Transportadora 1 ( $\text{NaOH } 1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ); **T** – Solução Transportadora (Água Destilada); **C.D.G.** – Camara de Difusão Gasosa; **C** – Condutivímetro; **D** – Descarte.

O procedimento descrito por WINTERS et al (2002), para extração dos aminoácidos foi usado para a extração da amônia das amostras de plantas.

### 3.4 Amostras

As amostras vegetais foram preparadas conforme descrito por WINTERS e colaboradores (2002), com modificação. As amostras inicialmente foram liofilizadas e moídas em moinho criogênico. Em seguida, pesou-se 100 mg em tubos tipo “falcon” de 50 mL e adicionou-se 4 mL de água. Tampou-se os tubos e aqueceu por 25 min em banho com água a temperatura de ebulição. Logo após, homogeneizou-se e submeteu-se a um resfriamento a  $20^{\circ}\text{C}$ . Esperou-se a decantação da matéria particulada e coletou-se 1,5 mL do sobrenadante para posterior centrifugação a  $3000 \times g$  por 10 minutos para clarificar a solução. Em seguida, o sobrenadante foi retirado para análise. O programa utilizado na moagem criogênica das amostras, está representado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Programa utilizado para moagem criogênica das amostras

<b>Etapa</b>	<b>Função</b>	<b>Tempo (min)</b>
1	pré-congelamento	3
2	moagem	2
3	resfriamento	1

O ciclo completo para moagem da amostra teve duração de 11 min, pois a etapa 2 foi repetida por três vezes, sendo intercalada pela etapa de resfriamento.

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

---

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Preparo da Amostra

O método de extração de aminoácidos adotado consiste na extração utilizando apenas água destilada como solvente (WINTERS, et al., 2002).

A liofilização e a moagem criogênica foram utilizados para o pré-tratamento das amostras. A liofilização proporciona a desidratação da amostra a baixas temperaturas e a moagem criogênica reduz o tamanho de partícula de maneira representativa. Ambos procedimentos empregam congelamento em meio N<sub>2</sub> líquido, evitando problemas de aquecimento e uma possível degradação dos aminoácidos (WINTERS, et al., 2002).

### 4.2 Estudos relacionados à otimização das variáveis do sistema

Testes para otimização do sistema foram realizados com a proposta do sistema de multicomutação representado na Figura 3.5.

Entre as avaliações realizadas para otimização do sistema, foi avaliada a influência da temperatura. Na ausência do banho de aquecimento não foi possível a ocorrência da reação. Com isso, foram realizados testes utilizando o banho de aquecimento, com parada de fluxo da zona de amostra na bobina de reação por 120 s, nas seguintes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C, sendo que, somente acima de 85 °C foi observado resposta no sistema. Diante disso, a temperatura foi fixada em 90°C. Para a realização desses experimentos, foi utilizada solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de ninidrina e solução tampão acetato de sódio com pH 5.4.

O valor do pH utilizado foi fixado em 5.4, com base nos resultados do trabalho de TAHBOUB e PARDUE (1985), onde o melhor valor de pH obtido foi de 5.4, concentração da ninidrina de 0,165 mol L<sup>-1</sup> e tempo de reação entre 60 e 120 s.

Com objetivo de obter a melhor mistura das soluções no sistema, diversos testes foram realizados visando a melhor forma de inserção das soluções no sistema proposto. Entre os testes realizados, foi avaliada a inserção dos reagentes de forma conjunta, e a adição dos reagentes em separado, alterando a ordem entre eles.

Entre todas as formas analisadas, a seqüência descrita anteriormente (item 3.2.4), foi a que apresentou melhor resposta, sendo o reagente, solução da amostra e tampão acetato de sódio.

Testes preliminares univariáveis foram realizados, visando obter o volume mais adequado para os reagentes utilizados e a melhor concentração para a ninidrina.

Primeiramente foram realizados testes para a definição do volume da amostra. Foi fixado o volume do reagente em 400  $\mu\text{L}$ , na concentração 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$  e 150  $\mu\text{L}$  do tampão acetato de sódio. O volume da amostra foi variado entre 100  $\mu\text{L}$  e 400  $\mu\text{L}$  (Figura 4.1).

Os resultados mostram que o volume da amostra fixado em 100  $\mu\text{L}$  o valor da absorbância aumentou gradualmente. Para um volume de 200  $\mu\text{L}$  a resposta obtida também aumentou de forma linear, sendo que quando o volume da amostra inserido foi de 400  $\mu\text{L}$  o sinal não apresentou aumento.

Nas pré-condições estabelecidas, na faixa de concentração estudada na curva analítica (até  $1,5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de cisteína), o volume de 200  $\mu\text{L}$  apresentou-se adequado.

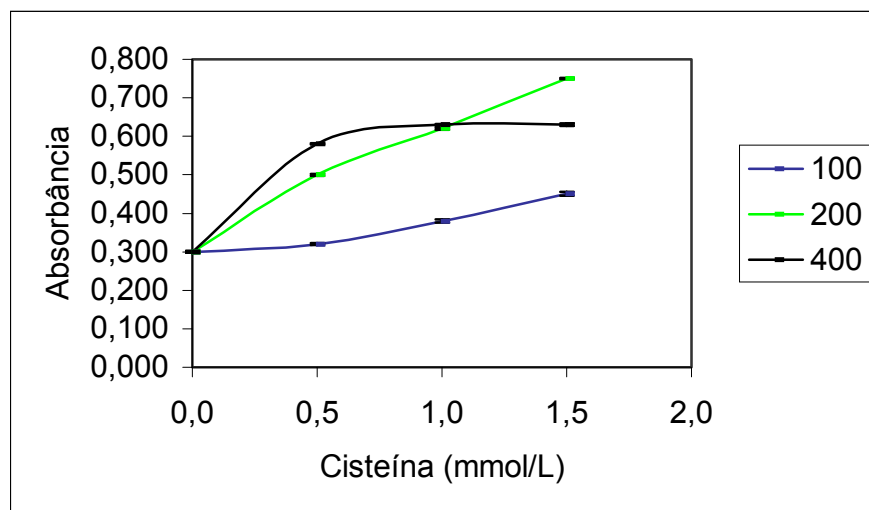


Figura 4.1 – Efeito do aumento do volume da amostra. Condições: 400  $\mu\text{L}$  de ninidrina 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$ , 150  $\mu\text{L}$  da solução tampão acetato de sódio. Os volumes avaliados foram de 100, 200 e 400  $\mu\text{L}$ .

Para avaliar o efeito do volume de ninidrina sobre o sinal analítico no método, foi realizado um teste variando o volume da ninidrina em 100, 200 e 400  $\mu\text{L}$ . Os volumes da amostra e, da solução tampão foram ambos fixados em 150  $\mu\text{L}$  (Figura 4.2).

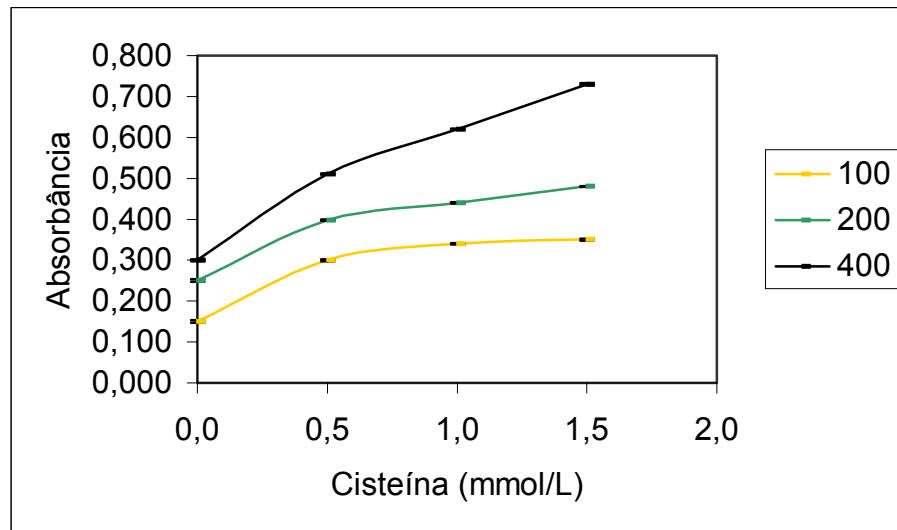


Figura 4.2 – Efeito do volume da ninidrina ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) na absorbância, usando 150  $\mu\text{L}$  de solução analítica de cisteína e 150  $\mu\text{L}$  da solução tampão acetato de sódio (pH 5.4). Os volumes de ninidrina usados foram de 100, 200 e 400  $\mu\text{L}$ .

Os resultados do estudo realizado para avaliar o efeito do volume da ninidrina mostraram um aumento significativo na absorbância com o aumento do volume do reagente. Com base nesses resultados o volume de reagente para 150  $\mu\text{L}$  de solução padrão é de 400  $\mu\text{L}$ .

Para avaliar o efeito da concentração da ninidrina no método foi realizado um teste usando a ninidrina nas seguintes concentrações: 0,2; 0,3 e 0,4  $\text{mol L}^{-1}$ . Os volumes da amostra e da solução tampão foram fixados em 150  $\mu\text{L}$ , e o volume da ninidrina em 350  $\mu\text{L}$  (Figura 4.3).

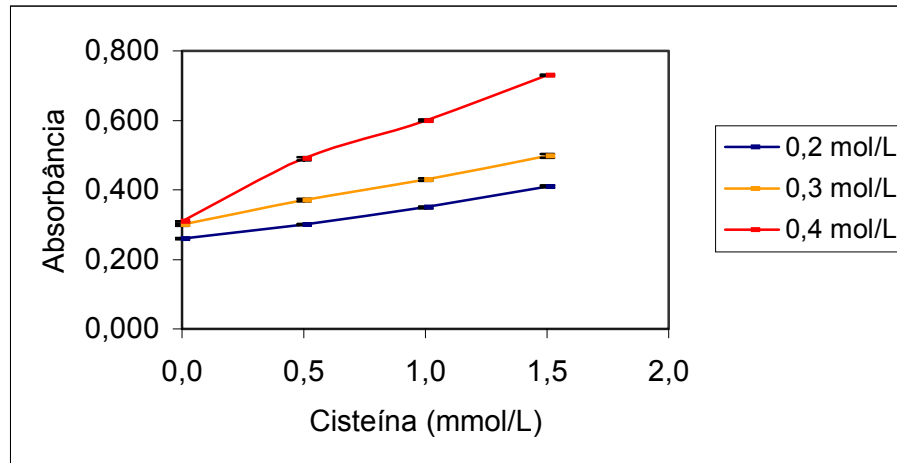


Figura 4.3 – Efeito da concentração da ninidrina na absorbância, usando 350 $\mu$ L de ninidrina, 150  $\mu$ L da solução analítica e 150  $\mu$ L da solução tampão acetato de sódio (pH 5,4). As concentrações de ninidrina usadas foram de 0,2; 0,3 e 0,4 mol L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos mostraram um aumento no valor da absorbância com o aumento da concentração da ninidrina.

Com o objetivo de avaliar os resultados obtidos e uma possível interação entre as variáveis do sistema em um menor número de experimentos, as variáveis do sistema foram analisadas de forma conjunta através de um planejamento experimental.

Os parâmetros estudados que apresentam influência direta no sinal analítico como volume da amostra, volume da ninidrina, concentração da ninidrina, tempo de parada de fluxo na bobina de mistura e tamanho da bobina foram avaliados conjuntamente, empregando a metodologia do planejamento fatorial (BARROS NETO et al., 1995). As médias das absorbâncias obtidas em cada experimento e a matriz do planejamento fatorial estão representadas na TABELA 4.1.

Tabela 4.1 – Planejamento fatorial  $2^5$  utilizado para otimização do sistema de multicomutação proposto.

<b>Conc. Ninidrina (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume Ninidrina (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volume Amostra (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Tempo Parada (s)</b>	<b>Tamanho Reator (cm)</b>	<b>Média Absorbância (n=3)</b>
0,5	100	50	30	75	0,241 $\pm$ 0,010
0,16	100	50	15	75	0,208 $\pm$ 0,015
0,5	260	260	15	25	0,537 $\pm$ 0,003
0,5	100	50	30	25	0,280 $\pm$ 0,005
0,16	260	260	30	25	0,497 $\pm$ 0,003
0,5	100	260	30	25	0,288 $\pm$ 0,010
0,16	100	260	30	75	0,188 $\pm$ 0,017
0,5	260	260	30	75	0,791 $\pm$ 0,003
0,16	100	50	30	25	0,206 $\pm$ 0,008
0,16	260	260	15	75	0,525 $\pm$ 0,005
0,16	260	50	15	25	0,318 $\pm$ 0,003
0,5	260	50	30	25	0,616 $\pm$ 0,007
0,16	260	50	30	75	0,520 $\pm$ 0,006
0,16	100	260	15	25	0,202 $\pm$ 0,008
0,5	260	50	15	75	0,510 $\pm$ 0,006
0,5	100	260	15	75	0,296 $\pm$ 0,005

Dentre as variáveis estudadas, os parâmetros de maior influência no sistema, foram isolados e analisados separadamente. Foram estudados os parâmetros: volume da amostra, volume de ninidrina e tempo de parada de fluxo, utilizando a metodologia de superfície de resposta. Um planejamento fatorial do tipo  $2^3$  + estrela foi montado para a realização desse estudo. A Tabela 4.2 representa a matriz de planejamento e as médias das absorbâncias, calculadas em triplicata. O gráfico de Pareto obtido através dos resultados do planejamento experimental mostrou que todas as variáveis analisadas são representativas, sendo as variáveis que apresentam a maior representatividade foram o volume da ninidrina, concentração



da ninidrina, seguido do volume da amostra e do tempo de parada de fluxo no banho aquecido.

Tabela 4.2 – Planejamento fatorial  $2^3$  + estrela, utilizado para otimização do sistema proposto.

<b>Volume Amostra (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volume Ninidrina (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Tempo Parada (s)</b>	<b>Média Absorbância (n = 3)</b>
310	310	30	0,701 $\pm$ 0,003
465	310	30	0,577 $\pm$ 0,010
310	310	30	0,704 $\pm$ 0,006
155	310	30	0,845 $\pm$ 0,006
410	410	20	0,682 $\pm$ 0,003
310	465	30	0,805 $\pm$ 0,006
310	310	30	0,708 $\pm$ 0,003
310	310	30	0,710 $\pm$ 0,005
310	310	13	0,568 $\pm$ 0,008
310	310	30	0,704 $\pm$ 0,005
310	310	47	0,826 $\pm$ 0,004
310	310	30	0,707 $\pm$ 0,007
310	310	30	0,705 $\pm$ 0,006
310	310	30	0,708 $\pm$ 0,008
410	410	40	0,751 $\pm$ 0,005
200	200	40	0,641 $\pm$ 0,013
200	410	40	0,972 $\pm$ 0,008
310	155	30	0,339 $\pm$ 0,005
410	200	20	0,372 $\pm$ 0,011
200	410	20	0,713 $\pm$ 0,012
410	200	40	0,412 $\pm$ 0,010
200	200	20	0,536 $\pm$ 0,005
310	310	30	0,708 $\pm$ 0,008

A equação:

Abs = - 0,167091 – 0,00943174 x Volume Amostra + 0,166578 x Volume Ninidrina + 0,0140132 x Tempo Parada – 0,000758693 x Volume Amostra<sup>2</sup> + 0,00442708 x Volume Amostra x Volume Ninidrina – 0,00160625 x Volume Amostra x Tempo Parada – 0,0130299 x Volume Ninidrina<sup>2</sup> + 0,00114375 x Volume Ninidrina x Tempo Parada – 0,0000768995 x Tempo Parada<sup>2</sup>, representa a superfície de resposta para o sistema estudado. (BARROS NETO et al., 1995). Na Figura 4.4 está representado o gráfico de Pareto, o qual mostra a influência de cada uma das variáveis estudadas, os parâmetros representativos no sistema e também o efeito das interações entre as variáveis. À direita da linha do gráfico de Pareto as variáveis se mostram representativas. Essa linha representa uma faixa de confiança de 95%.

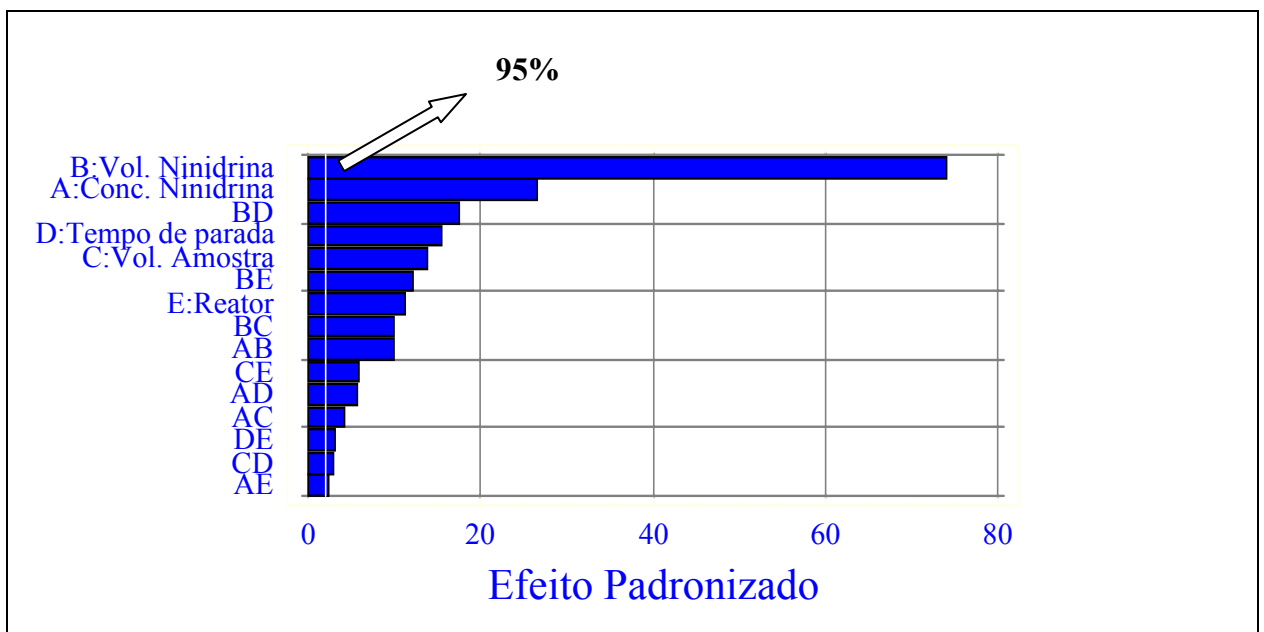


Figura 4.4 – Gráfico de Pareto representando a influência das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2<sup>5</sup>.

Com o objetivo de avaliar somente as variáveis mais representativas, um segundo planejamento experimental foi realizado. Através dos resultados obtidos pode-se confirmar a relevância do volume da ninidrina e do volume da amostra como os parâmetros de maior influência no sistema (FIGURA 4.5).

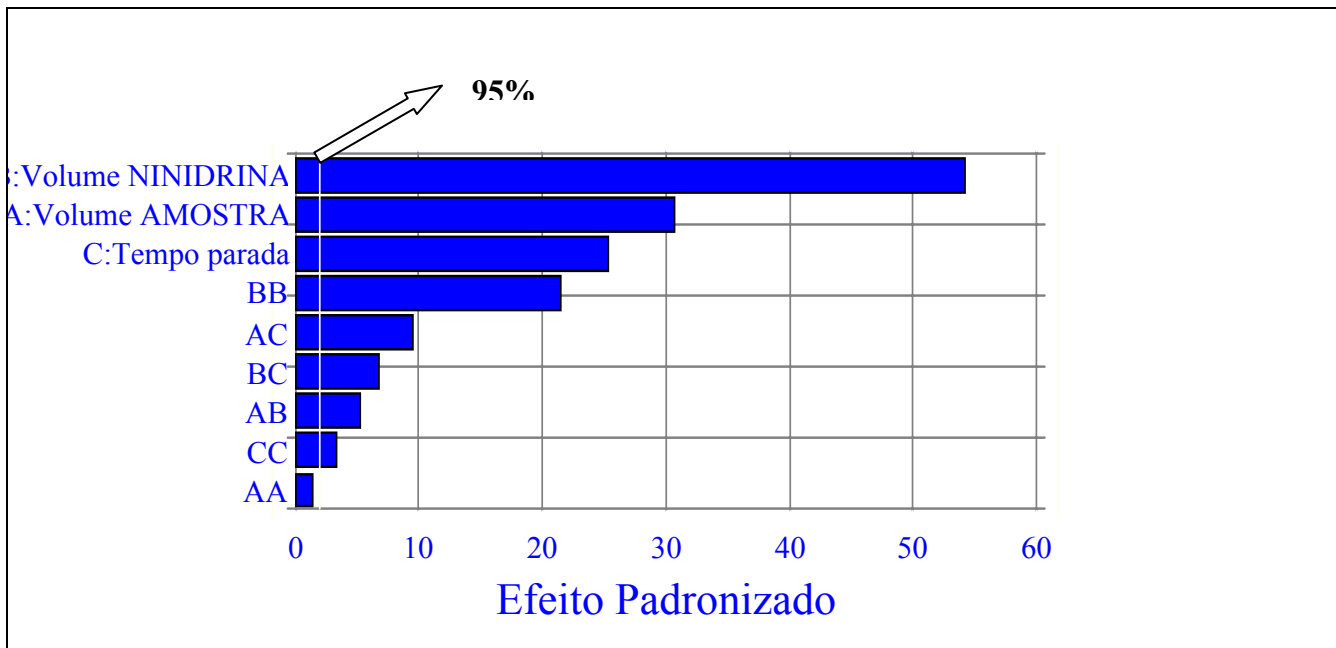


Figura 4.5 – Gráfico de Pareto representando a influência das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial  $2^3 +$  estrela.

Para avaliar o efeito do volume da amostra juntamente com o volume da ninidrina, foi construído um gráfico de superfície de resposta estimada. (Figura 4.6).

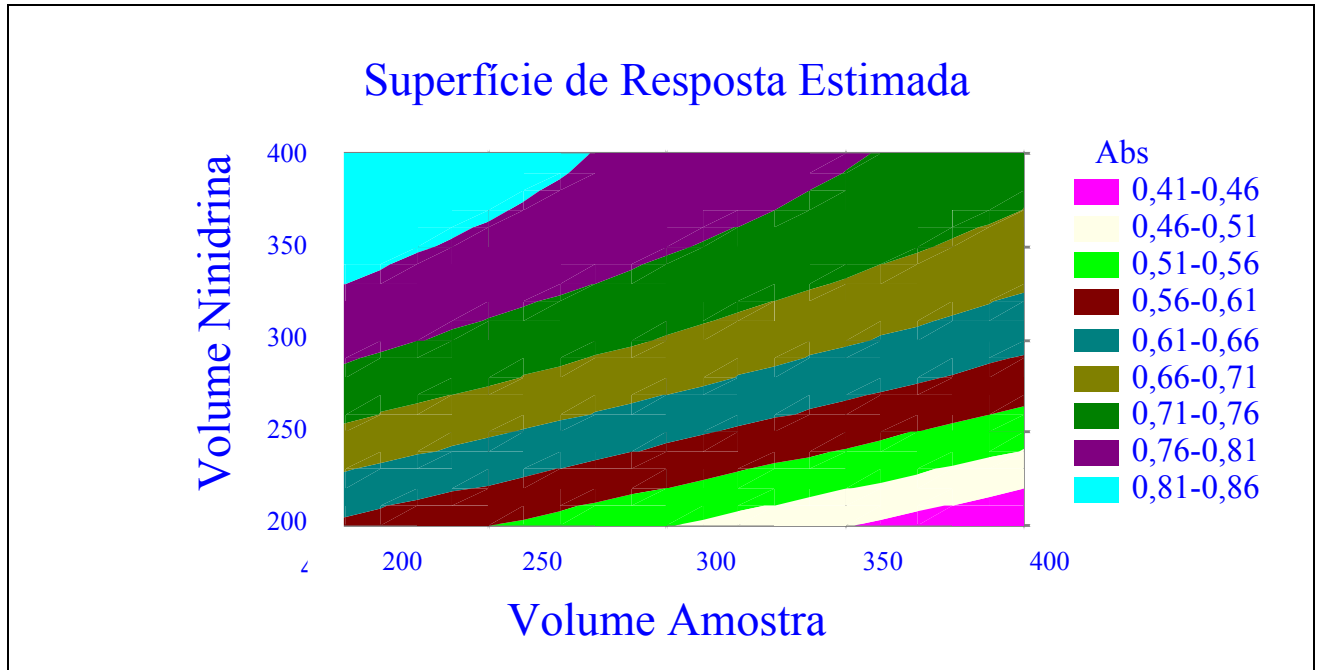


Figura 4.6 – Gráfico de superfície de resposta estimada para volume da ninidrina e volume da amostra.

A superfície de resposta mostra um valor maior de absorbância na área azul do gráfico, para um volume de ninidrina entre 350 e 400  $\mu\text{L}$ , e um volume de amostra de até 200  $\mu\text{L}$ .

Dessa forma foram definidos os valores para os volumes empregados para determinação de aminoácidos totais, sendo 360  $\mu\text{L}$  de ninidrina, 150  $\mu\text{L}$  da amostra e 150  $\mu\text{L}$  do tampão acetato de sódio.

Os aminoácidos estão divididos em quatro grupos e estão classificados quanto à sua estrutura. Por isso, os aminoácidos diferem quanto ao tempo de reação, sendo que alguns deles apresentam a reação completa em um intervalo de tempo menor e para outros a reação se completa com um tempo um pouco maior (FRIEDMAN, 2004).

Com o objetivo de avaliar o tempo da reação para diferentes padrões de aminoácidos e, desta forma, garantir a participação de todos os aminoácidos na reação no sistema proposto. Estudos complementares foram realizados visando obter um tempo ideal de parada de fluxo no banho de aquecimento, garantindo desta forma que a reação se complete para todos os aminoácidos presentes nas amostras, evitando a obtenção de resultados errôneos.

Para a realização deste estudo foram usados cinco padrões de aminoácidos, que se diferem quanto à sua classificação descrita anteriormente.

Foram usados os padrões cisteína, leucina, cistina, arginina e glicina. Os tempos de reação usados neste experimento foram de 0, 40, 90, 120, 150 e 180 s para os respectivos padrões, realizando todos os experimentos em triplicata, nas condições experimentais mais adequadas obtidas a partir do planejamento experimental. A FIGURA 4.7 mostra o efeito do aumento do tempo de parada no banho de aquecimento para o padrão cisteína. Utilizando uma solução com concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de cisteína, a qual foi preparada a partir da solução estoque descrita no item a. Após os experimentos, observou-se que a reação para o padrão cisteína se completa após um tempo de 90 segundos, sendo que quando foi usado um intervalo de tempo maior que 120 e 150 s, a absorbância registrada permaneceu constante.

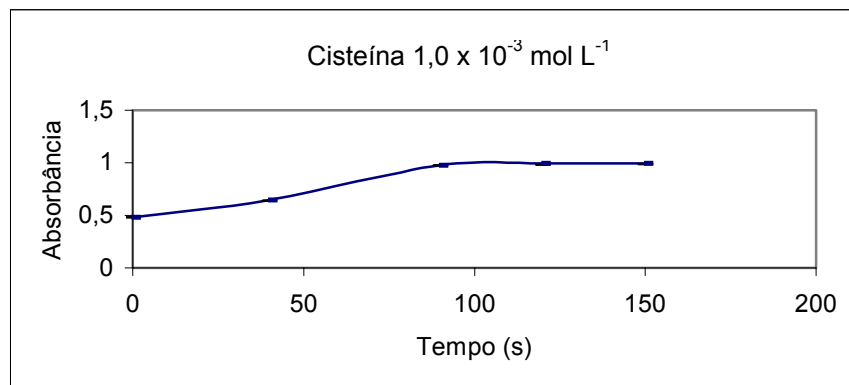


FIGURA 4.7 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão cisteína  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

O mesmo experimento foi realizado para o padrão leucina, também com objetivo de avaliar o efeito do tempo de reação. A solução de leucina foi preparada com concentração de  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a qual foi preparada a partir da solução estoque descrita no item b. A FIGURA 4.8 mostra que acima de 90 s o sinal registrado permaneceu constante.

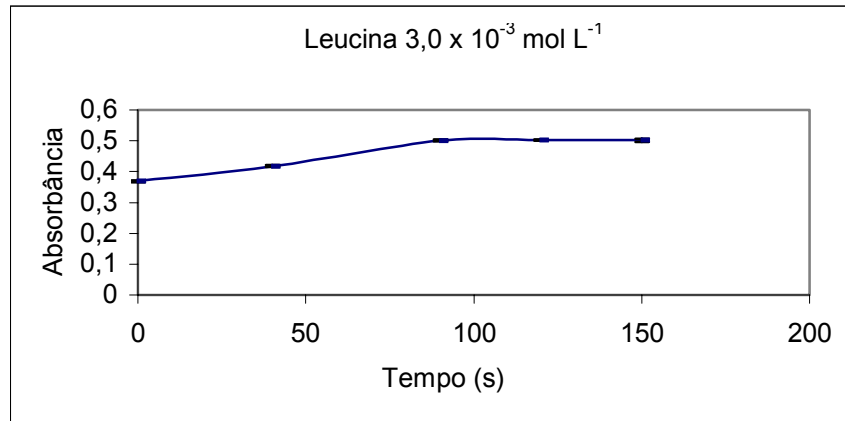


FIGURA 4.8 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão leucina  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

O mesmo experimento foi realizado para o padrão cistina na concentração  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a qual foi preparada a partir da solução estoque descrita no item c. A FIGURA 4.9 mostra serem necessários 150 s para que o valor de absorbância se mantivesse constante.

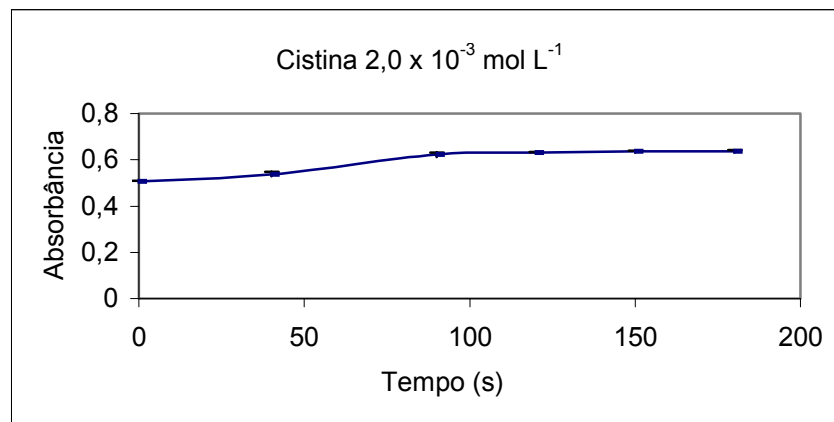


FIGURA 4.9 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão cistina  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Dando seqüência aos experimentos relacionados ao tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento, foi avaliado o efeito do tempo de parada de fluxo para o padrão arginina com concentração de  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a qual foi preparada a partir da solução estoque descrita no item d. A FIGURA 4.10 mostra que acima de 150 segundos a reação é completada.

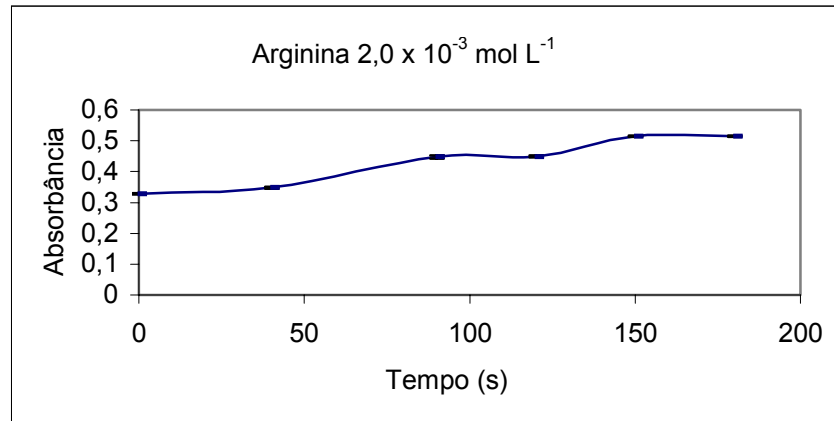


FIGURA 4.10 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão arginina  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Finalizando os experimentos relacionados ao tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento, foi avaliado o efeito do tempo de parada para o padrão glicina com concentração de  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a qual foi preparada a partir da solução estoque descrita no item e. A FIGURA 4.11 mostra que com o aumento do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento, a reação se completa com um tempo de 120 s, devido ao fato que acima desse tempo o valor de absorbância permanece inalterado.

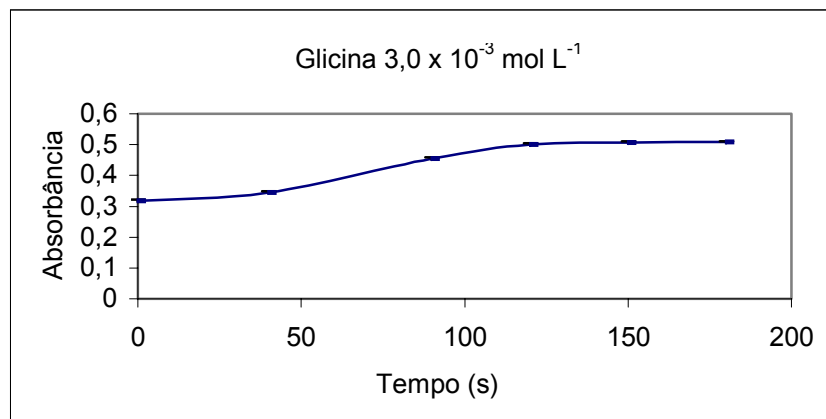


FIGURA 4.11 - Efeito do tempo de parada de fluxo no banho de aquecimento para o padrão glicina  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Após os testes realizados com diferentes padrões observando o tempo necessário para que todos os aminoácidos presentes nas amostras reagissem com a ninidrina, foi fixado o tempo de 150 s de parada de fluxo no banho aquecido a

90°C. Os resultados obtidos nos experimentos realizados para o tempo de reação aos diferentes grupos de aminoácidos são semelhantes aos resultados obtidos por TAHBOUB e PARDUE (1985), que obteve tempo entre 120 e 150 s. Esse experimento foi necessário por se tratar a proposta de um método para a determinação de aminoácidos totais, evitando assim a obtenção de resultados incompletos, mesmo se tratando de um sistema em fluxo, onde não há necessidade de se completar as reações. Desta forma, foi possível realizar o experimento empregando apenas um aminoácido como padrão analítico.

### 4.3 Teste de interferentes

Segundo LEE et al. (2003), os metais Cu (II) e Fe (III) apresentam um decréscimo na absorbância para determinação de alguns aminoácidos na reação com a ninidrina.

Para avaliar a interferência dos metais no método proposto, foi inicialmente realizada a extração aquosa dos aminoácidos em amostras de uma forrageira capim Tanzânia. Em seguida foi realizada a determinação da concentração dos metais cobre e ferro utilizando o ICP OES (espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado). As concentrações encontradas na amostra para os metais foram de 0,04 mg L<sup>-1</sup> de Cu e 0,34 mg L<sup>-1</sup> de Fe, equivalentes respectivamente a 0,63 x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e 6,07 x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>.

A partir das concentrações obtidas na amostra analisada, foram realizados testes de adição dos metais em diferentes concentrações e diferentes pontos da curva analítica. As concentrações testadas foram de 1,0 x10<sup>-4</sup>; 5,0 x10<sup>-4</sup> e 1,0 x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de Cu e Fe nos pontos da curva analítica.

Após o teste de adição, os resultados obtidos mostraram que os metais não apresentaram interferência no sinal analítico para o sistema proposto dentro da faixa avaliada.

Segundo WINTERS (2002), a amônia apresenta interferência no método da ninidrina. O autor sugere a eliminação da amônia das amostras, a ser feita em meio alcalino, a partir da adição de hidróxido de sódio 2,5% (m/v) e incubação em frascos tampados, por uma hora, a 25 °C.



Seguindo o procedimento proposto por WINTERS (2002), foi realizada a extração dos aminoácidos, conforme descrito no item 3.2 e em seguida, foi feita a determinação da quantidade de amônia contida em amostras de capim tanzânia, utilizando sistema de análise por injeção em fluxo proposto por LEMOS et al., (2002) com alguma modificação, cujo detalhamento é descrito no item 3.3. Inicialmente foi construída a curva analítica para a determinação de amônia nas amostras.

Para construção da curva analítica, foi utilizada uma solução estoque de nitrato de amônio com concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , diluída para os seguintes valores: 5, 10, 20 e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . A FIGURA 4.12 mostra a curva analítica para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

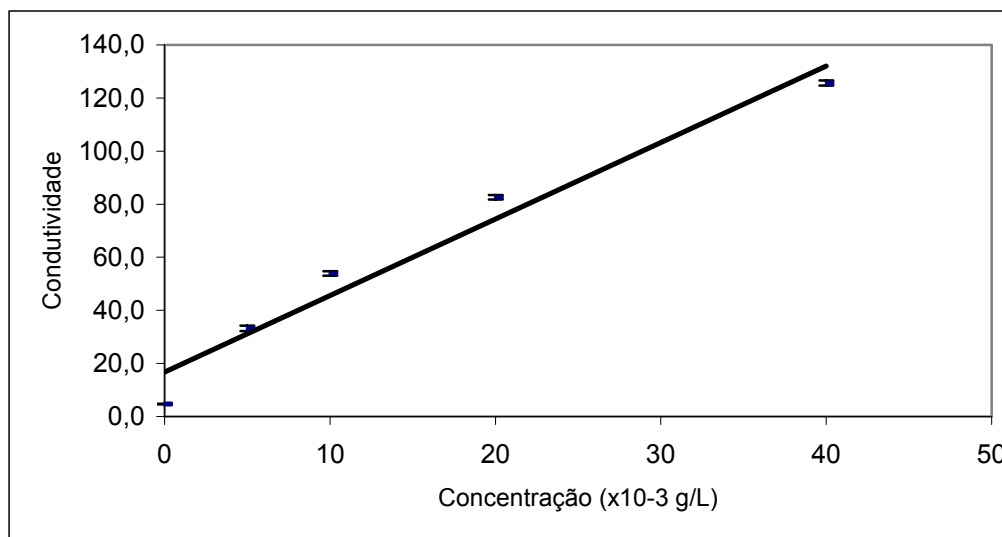


FIGURA 4.12 – Curva analítica para análise de amônia na amostra.

O resultado obtido na amostra avaliada foi igual a  $1,77 \text{ mg L}^{-1}$  ou,  $0,104 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4$  presentes em solução.

Testes foram realizados fazendo a adição de amônia na curva analítica. Para a realização dos testes foram adicionados  $2,0 \times 10^{-4}$ ;  $5,0 \times 10^{-4}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de amônia em todos os pontos da curva analítica, sendo que, com a adição não houve qualquer interferência no sinal analítico. A seguir, para se certificar da não interferência, adicionou-se uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  como amostra. Para a realização do experimento foram preparadas soluções nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 50 e  $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , visando obter algum sinal analítico. Os resultados mostraram que somente acima de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  houve resposta do sistema.

#### 4.4 Aplicação Analítica

Com o sistema proposto, as seguintes condições foram estabelecidas: volume do reagente 350 $\mu$ L, volume da solução tampão acetato de sódio 150  $\mu$ L e volume da amostra 150  $\mu$ L. O padrão empregado foi a cisteína, sendo a curva analítica: 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0  $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Na FIGURA 4.13 é apresentada a curva analítica obtida.

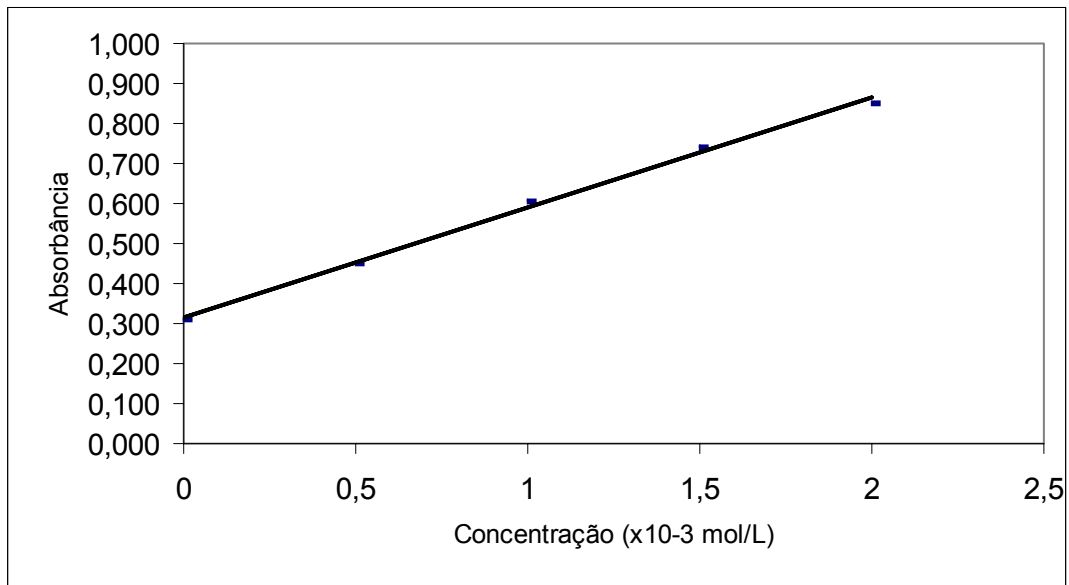


Figura 4.13 – Curva analítica para padrão cisteína.

Através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área, foi calculado o limite de detecção e quantificação através das equações 1 e 2, respectivamente, tendo sido obtidos os valores de  $3,6 \times 10^{-5}$  mol/L para o limite de detecção e de  $1,09 \times 10^{-4}$  mol/L para o limite de quantificação.

$$LD = 3,33 \frac{DP}{B} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{DP}{B} \quad (2)$$

onde: DP é o desvio padrão da reta de calibração

B é o coeficiente angular da reta de calibração

O sistema de multicomutação possibilita através do programa utilizado, fazer a aquisição dos dados no sistema. Através do programa foi realizada a aquisição dos dados gerados na construção da curva analítica, sendo o perfil do sinal analítico gerado mostrado na Figura 4.14, demonstrando uma boa repetibilidade entre os sinais analíticos obtidos.

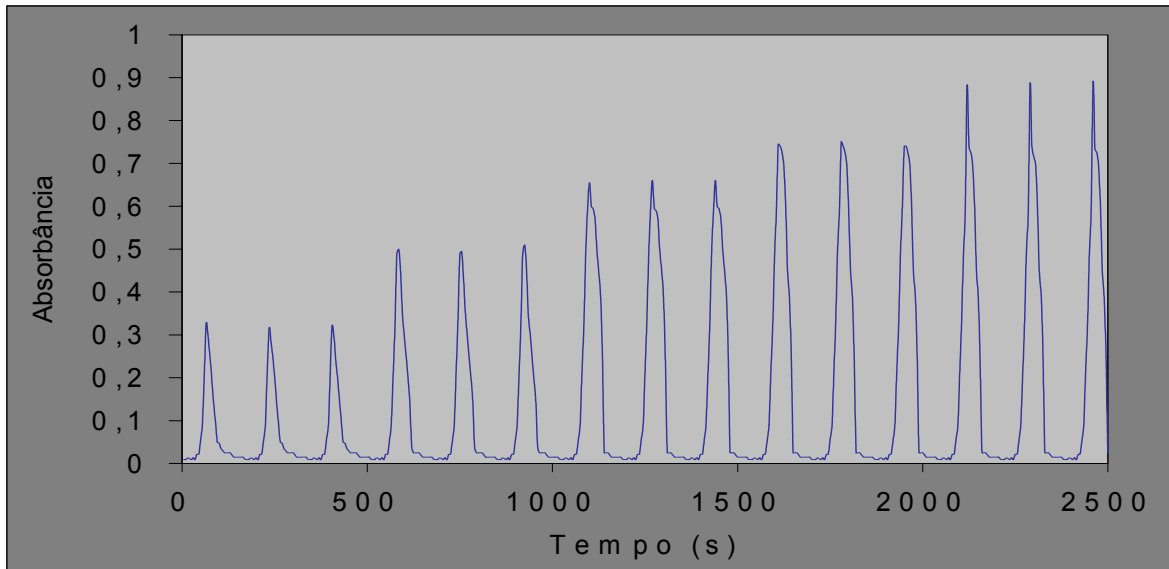


Figura 4.14 – Sinal analítico gerado no sistema de multicomutação proposto. Da esquerda para direita, sinais analíticos da solução de referência para 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0  $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

Conforme pode ser observado na Figura 4.14, o branco da solução apresenta um valor de absorbância entre 0,300 e 0,320, que ocorre devido ao solvente 2-metoxietanol, utilizado no preparo da solução de ninidrina.

Para avaliar a absorbância registrada para o branco da solução, foram realizados testes adicionando as soluções no sistema de forma independente. Com isso foi observado que o valor registrado para o branco da solução, é referente ao solvente 2- metoxietanol, utilizado para o preparo da solução de ninidrina. Este apresenta um valor constante de absorbância no comprimento de onda utilizado, mesmo quando adicionados volumes maiores da solução.

Com o objetivo de avaliar o método proposto, foi realizado um experimento utilizando um reagente alternativo, o reagente 4 – aminoantipirina. Este reagente apresenta em sua estrutura um grupo amino ligado na posição 4 do anel aromático presente na molécula. Com isso, foram preparadas diluições de uma solução estoque 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A curva analítica foi construída usando soluções de 4 –

aminoantipirina nas seguintes concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

FIGURA 4.15.

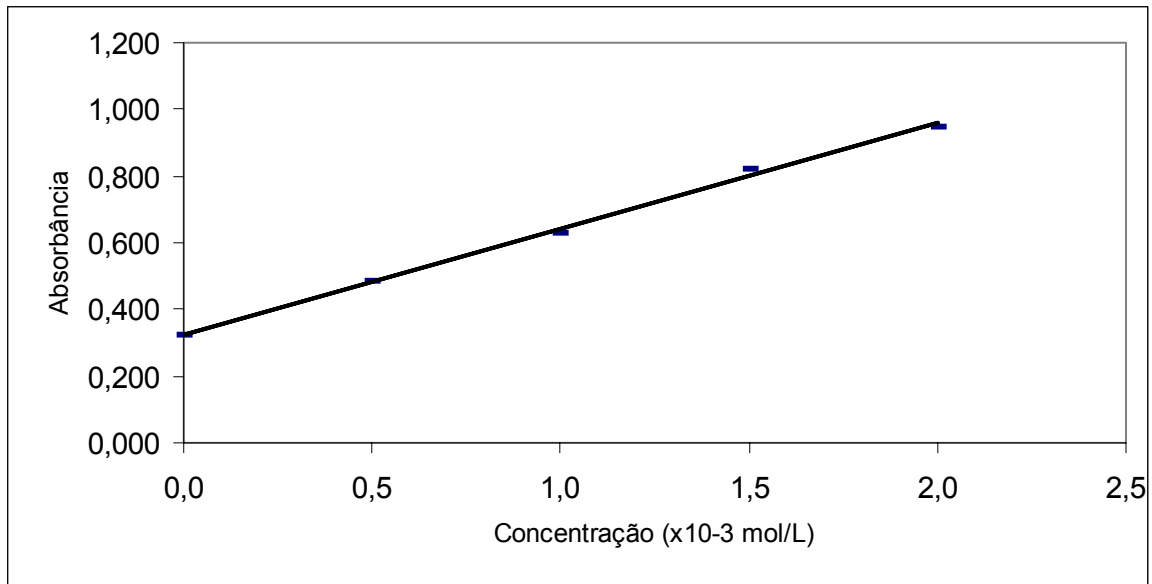


FIGURA 4.15 – Curva analítica para 4 – aminoantipirina.

O resultado do teste usando o reagente 4 – aminoantipirina apresentado na FIGURA 4.15 mostra uma resposta linear quando aplicado o reagente ninidrina, com coeficiente de determinação de 0,9970.

Uma vez estabelecidas às condições operacionais do sistema, foi então realizado o teste de adição e recuperação selecionando três amostras para a realização do experimento. O teste tem como objetivo a validação do sistema, no qual a recuperação do padrão é calculada pela análise das amostras, sendo adicionadas nas amostras quantidades conhecidas do mesmo. Nesses testes adicionou-se concentrações de 5,0 x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e 1,0 x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> do padrão cisteína, para amostras de capim forrageiras. A adição do padrão nas amostras foi realizado antes do processo de extração dos aminoácidos.

A adição do padrão foi realizada no processo de extração feito nas amostras, sendo adicionado o padrão cisteína no preparo da solução das amostras para um volume final de 4 mL. Os resultados de adição e recuperação são obtidos através da equação:

$$\text{Rec. (\%)} = C1 - (C2/C3) \times 100$$

Onde: C1 = Concentração obtida na amostra com adição

C2 = Concentração obtida na amostra sem adição

C3 = Concentração adicionada

Os resultados obtidos no teste de adição e recuperação estão representados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados obtidos no teste de adição e recuperação para as respectivas amostras.

<b>Amostra</b>	<b>% Recuperação</b>	<b>Desvio Padrão Relativo</b>
Capim Tanzânia <sup>a</sup>	96	0,99
Paspalum <sup>a</sup>	96	0,38
Guandú <sup>a</sup>	101	0,54
Capim Tanzânia <sup>b</sup>	97	0,75
Paspalum <sup>b</sup>	96	0,28
Guandú <sup>b</sup>	100	0,35

a: adição de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , e b:  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de cisteína. (n = 3)

Seguido do teste de adição e recuperação, a determinação de aminoácidos totais foi realizada em um conjunto de amostras, sendo os resultados mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultados obtidos no sistema proposto para as respectivas amostras.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração de aminoácidos g Kg<sup>-1</sup></b>	<b>Desvio Padrão Relativo</b>
Capim Tanzânia	4,61	0,71
Talo de Guandu	3,58	1,00
Folhas de Guandu	2,04	1,49
Paspalum	2,45	0,85
Bagaço de cana	0,94	1,32
Tomate	11,88	0,99

(n = 3)

## 4.5 Tratamento de Resíduo

O método proposto para determinação de aminoácidos totais usando a ninidrina, gera um resíduo de origem orgânica, o qual deve ser devidamente tratado antes do descarte em função da sua toxicidade quando em concentrações elevadas. A concentração do resíduo gerado será analisada, e se necessário o resíduo será devidamente tratado para posterior descarte. Nos últimos anos, processos oxidativos avançados (POAs), têm surgido como uma excelente alternativa para o tratamento desses resíduos, principalmente em razão da sua elevada eficiência de degradação a substratos resistentes. Uma alternativa para o tratamento de resíduo de compostos orgânicos é a reação Fenton ou foto-Fenton. Trata-se de uma reação eficiente no tratamento de resíduos orgânicos, a base de radiação UV usando Fe (II). Resultados de estudos mostraram que a reação Foto-Fenton foi eficiente para o tratamento de resíduos orgânicos, conseguindo a mesma eficiência em um intervalo de tempo menor aos demais métodos de tratamento por processos oxidativos avançados. (TIBURTIUS e ZAMORA, 2005).

*CONCLUSÕES*

---

## 5. Conclusões

O procedimento proposto neste trabalho, relativo à determinação de aminoácidos totais, demonstrou vantagens que os procedimentos empregando multicomutação apresentam com relação à versatilidade, baixo consumo de reagentes e menor geração de resíduos.

No sistema proposto a reação se completa totalmente em apenas 150 segundos (à 90°C), no método manual são necessários 25 minutos para a ocorrência da reação.

Através do sistema de multicomutação, foi possível construir um sistema simples, no qual foi usado um único canal de bombeamento e conseqüentemente uma bomba peristáltica de canal único.

A liofilização e a moagem criogênica adotadas no preparo das amostras ajudam a reduzir degradação dos aminoácidos.

A amônia apresenta uma resposta ao método da ninidrina, mas somente quando usado em concentrações superiores a  $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo esta uma concentração 1000 vezes superior a concentração de amônia encontrada na amostra estudada.

Os metais cobre (II) e ferro (III), não apresentaram interferência no método proposto para determinação de aminoácidos.

O sistema não apresentou efeito de memória na seqüência das análises, sendo que a limpeza do sistema se mostrou eficiente, utilizando apenas água.

A utilização de um desborbulhador foi necessária devido à alta temperatura do banho de aquecimento (a 90°C), e o desprendimento das bolhas de ar.

A curva analítica obtida no sistema apresentou uma faixa linear de trabalho até  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com limite de detecção de  $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e limite de quantificação de  $1,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## 6. Referências Bibliográficas

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S & BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 2ª Ed., Campinas, Editora da Unicamp, Cap. 3 e 5, 1995.

BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B.F.; ZAGATO, E. A. G. "Solvent extraction in continuous flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material". *Anal. Chim. Acta*, **101**: 9, 1978.

CONN, E.E. *Introdução a Bioquímica*, São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 62 - 77, 1980.

COSTIN, J. W.; FRANCIS, P. S.; LEWIS, S. W. "Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection". *Anal. Chim. Acta*, **480**: 67, 2003.

FRIEDMAN, M. "Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences". *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 385, 2004.

IBOLYA, M. P.; MARGIT, P. S. "Spectrophotometric determination of tryptophan in intact proteins by the acid ninhydrin method". *Anal. Biochem.*, **177**: 16, 1989.

ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G.; CALATAYUD, J.M. "Selective chlorine determination by gas diffusion in a tandem flow assembly and spectrophotometric detection with o-dianisidine". *Anal. Chim. Acta*, **443** (1): 153, 2001.

LEE, S.W.; LIM, J.M.; BHOO, S.H. "Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*". *Anal. Chim. Acta*, **480**: 267, 2003.

LEE, Y.; TAKAHASHI, T. "An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin". *Anal. Biochem.*, **14**: 71, 1966.

LEFEVRE, J.; BIGOT, J.; BOUCAUD, J. "Origin of foliar nitrogen and changes in free amino-acid composition content of leaves, stubble, and roots of perennial ryegrass during re-growth after defoliation". *J. of Experimental Botany*, **42** (234): 89, 1991.

LEHNINGER, A. L. *Princípios da Bioquímica*, São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 49 - 65, 1984.

LEMOS, S.G.; NOGUEIRA, A.R.A.; SOUSA, G.B. "Determinações de formas inorgânicas de nitrogênio por análise em fluxo". *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 1. EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, 2002.

MOORE, S.; STEIN, W. "A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds". *Journal Biol. Chem.*, **211**: 907, 1954.

MURACKI, H.; HIGUCHI, K.; SASAKI, M.; KORENAGA, T. TOEI, K. "Fully automated system for the continuous monitoring of ammonium ion in fish farming plant sea water by flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta.*, **261**: 345, 1992.

PASQUINI, C.; FARIA, L.C. "Operator-free flow injection analyzer". *J. Autom. Chem.*, **13**: 143, 1991.

PASSOS, L. P. "*Métodos Analíticos e Laboratoriais em Fisiologia Vegetal*". Embrapa. Coronel Pacheco – MG, 1996.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F. & KRONGA, E. A. M. "A análise química por injeção em fluxo contínuo". *Química Nova*, **12** (1): 82, 1989.

REIS, B.F.; GINÉ,M.F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. LF. C.; LAPA, R.A.. "Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plants digests". *Anal. Chim. Acta.*, **293**: 129, 1994.

ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S.; SANTOS, J.L.M. "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends". *Anal. Chim. Acta*, **468**: 119, 2002.

ROCHA, F.R.P.; FATIBELLO,O.; REIS,B.F. "A multicommutated flow system for sequential septrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations". *Talanta*, **59** (1): 191, 2003.

ROKUSHIKA, S.; MURAKAMI, F.; HATANO, H. "Single-wavelength detection for amino acid analysis". *J.I of Chromatography*, **130**: 324, 1977.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. "Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis". *Anal. Chem.*, **78**: 145, 1975.

SODEK, L.; RUZICKA, J.; STEWART, J.W.B.; "Rapid determination of protein in plant material by flow injection spectrophotometry with trinitrobenzenesulfonic acid". *Anal. Chim. Acta*, **97**: 327, 1978.

SPACKAM, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. "Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids". *Anal. Chem.* **30**: 1190, 1958.

TAHBOUB, Y. R.; PARDUE, H. L. "A predictive-kinetic method for the quantitation of amino acids with ninhydrin". *Anal. Chim. Acta*, **173**: 23, 1985.

TIBURTIUS, E.R.L.; ZAMORA, P.P. "Degradação de BTXS via processos oxidativos avançados". *Química Nova*, **28** (1): 61, 2005.

TUMANG,C.A.; BORGES,E.P.; REIS,B.F. "Multicommutation flow system for spectrophotometric L(+)-lactate determination in silage material using an enzymatic reaction". *Anal. Chim. Acta*, **438** (1-2): 59, 2001.

VAN STANDEN, J.F.; McCOMARCK, T. "Sequential-injection spectrophotometric determination of amino acids using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid". *Anal. Chim. Acta*, **369**: 163, 1998.

VIEIRA, J.A.; RAIMUNDO, I.M.; REIS, B.F. "Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems". *Anal. Chim. Acta*, **438** (1-2): 75, 2001.

WINTERS, A. L.; LLOYD, J.D.; JONES, R.; MERRY, R.J. "Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages". *Animal Feed Science and Technology*, **99**: 177, 2002.

ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ARRUDA, M. A. Z. Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, **400**: 249, 1999.