

**Artigo Número 42**  
**FUNDAMENTOS E MÉTODOS PARA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS**

Wagner Azis Garcia de Araújo<sup>1</sup>; Félix Inácio de Assis Jr<sup>2</sup>; Gabriel Fonseca Sobreira<sup>3</sup>

**Introdução**

Com a utilização crescente do conceito de proteína ideal para a preparação de rações para não ruminantes, demandou-se o conhecimento do perfil aminoacídico dos alimentos utilizados como fontes protéicas. Através deste conhecimento tornou-se possível uma adição mais exata dos aminoácidos sintéticos comercializados atualmente.

A Química Analítica compreende o conjunto de técnicas e medidas que visam caracterizar a natureza e determinar a composição de amostras de diferentes origens, em termos de elementos, espécies, ou agrupamentos de átomos ou moléculas.

A crescente demanda da sociedade por produtos de origem animal, a tipificação e disponibilidade de novos alimentos e tecnologias, e os avanços na informática e computação têm proporcionado o desenvolvimento de programas para o cálculo de rações. Porém, o desenvolvimento e a atualização dos cálculos de ração não têm sido acompanhados de atualização similar na qualidade dos dados que sustentam os programas (Scapim et al., 2003).

De acordo com Garrido (1996), um ponto crítico da aplicação prática de conhecimentos científicos gerados no campo da nutrição animal é o controle analítico de alimentos e produtos. Por isso, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas rápidas e sensíveis que vão alimentar os bancos de dados (Saliba et al., 2003).

Quase todas as propriedades físico-químicas características de um determinado elemento ou substância podem servir de base para se estabelecer um método analítico instrumental, seja ele qualitativo ou quantitativo. A emissão ou absorção de luz em diferentes regiões do espectro eletromagnético, as propriedades térmicas e elétricas, como condutividade de soluções ou potenciais redox e outras propriedades têm sido usadas na análise quantitativa, desde que se possa relacionar a propriedade medida com a concentração do analito.

Métodos tradicionais de análise incluem procedimentos químicos utilizados para separar os nutrientes em questão e mensurar o montante destes em uma dada quantidade nos alimentos. Os métodos tradicionais são trabalhosos, demorados e produzem resíduos tóxicos. Assim, este trabalho visa apresentar alguns aspectos básicos sobre alguns dos métodos e técnicas alternativos mais utilizados na determinação de aminoácidos.

**Métodos utilizados**

Dentre os métodos utilizados para a avaliação do conteúdo aminoacídico das amostras destacam-se:

1. A Cromatografia Iônica.
2. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)
3. Espectroscopia de Refletância do Infravermelho Próximo (NIRS)

<sup>1</sup> Zootecnista, Professor e Pesquisador da EPAMIG, Mestrando em Nutrição de Monogástricos, UFV.

<sup>2</sup> Zootecnista, Mestre em Nutrição de Monogástricos, UFV.

<sup>3</sup> Zootecnista, Mestrando em Nutrição de Ruminantes, UFV.

## Introdução à Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. É o método analítico usado para separar, detectar e quantificar uma grande quantidade de compostos. Ultimamente esta técnica vem sendo utilizada intensivamente na qualificação e quantificação de aminoácidos na análise de alimentos.

Os termos "cromatografia", "cromatograma" são atribuídos ao botânico russo "*Mikhael Semenovich Tswett*", que utilizou estes termos em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo em 1906. Porém, apenas na década de 30 *Kuhn e Lederer* "redescobriram" e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, repetindo as experiências de *Tswett* separando e identificando as xantofilas da gema do ovo, usando uma coluna recheada de carbonato de cálcio e éter de petróleo como fase móvel. A cromatografia por troca iônica também teve início na década de 30, com *Adams E Holmes*, que sintetizaram as primeiras resinas de troca iônica, baseadas em fenol e formaldeído. As resinas de poliestireno-divinilbenzeno, atualmente empregadas em análise bioquímica, foram inicialmente utilizadas por COHN na separação de aminoácidos e ácidos nucléicos. Esta técnica de separação de aminoácidos foi aperfeiçoada por Moore e Stein em 1958, utilizando uma bomba peristáltica para empurrar a fase móvel e um fotômetro para detecção, após reação para produzir os derivados com ninhidrina. Esta técnica ainda foi melhorada por Hamilton e Andrews, com a introdução de uma bomba tipo pistão, similar às utilizadas hoje em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC).

## Princípios da Cromatografia

O princípio da separação cromatográfica de uma mistura baseia-se nas diferenças de velocidade de transporte das substâncias individuais quando dissolvidas em um líquido ou gás (fase móvel) que flui através de um determinado meio (fase estacionária). Uma substância com maior afinidade pela fase estacionária irá fluir mais lentamente que as outras. As características das fases móvel e estacionária, do analito na fase móvel, do meio que serve como fase estacionária e a dinâmica de fluxo determinam a velocidade e precisão com que determinadas substâncias serão separadas.

As técnicas cromatográficas abrangem vários métodos de separação com uma característica comum: os componentes de uma mistura são distribuídos em duas fases, sendo uma estacionária (fixa) e uma móvel, que flui sobre a primeira, resultando em migração diferencial dos componentes da amostra. A fase estacionária pode ser líquida ou sólida e a fase móvel pode ser líquida ou gasosa. A cromatografia pode servir para analisar gases e íons inorgânicos; aminoácidos, açúcares, gorduras, vitaminas, drogas, hormônios e macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e vírus solúveis).

Há vários métodos de cromatografia e, por conseguinte várias classificações, porém, na análise de aminoácidos são utilizadas as técnicas de cromatografia em coluna. A fase móvel percorre uma coluna oca preenchida com uma resina composta de partículas microscópicas. O material a ser separado atravessa a coluna levado pelo fluxo da fase móvel e devido ao equilíbrio diferencial entre as duas fases (estacionária e móvel) há separação de seus componentes. O material sai pela extremidade terminal da coluna e é coletado em alíquotas para análise posterior. Na análise de aminoácidos são utilizadas basicamente a Cromatografia de Troca Iônica e a mais atual Cromatografia Líquida de Alto Desempenho.

### Preparo da Amostra

Os aminoácidos na maioria das situações laboratoriais apresentam-se na forma polipeptídica (proteínas e peptídeos). Para haver a individualização dos monômeros é necessário que haja o preparo da amostra antes de inseri-la na coluna cromatográfica.

Inicialmente deve-se proceder a moagem (1 mm), e subseqüentemente desengorduramento (1 mL de éter etílico, repetido 3 vezes), para então haver a liberação dos aminoácidos das amostras com os seguintes processos: hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação, em função dos aminoácidos a serem quantificados.

O peso da amostra varia em função do tipo de hidrólise e teor de proteína bruta do material a ser analisado, variando de 200 a 500 mg.

#### *Hidrólise ácida:*

Este tipo de processo é recomendado para a determinação da maioria dos aminoácidos excetuando-se o Triptofano que é completamente destruído, sendo recomendado outro tipo de processamento. É utilizado para este tipo de hidrólise o HCl (ácido clorídrico) a uma concentração de 6 N, colocada (a amostra) em estufa a 110 °C, por 24 horas.

#### *Hidrólise básica:*

Esta é a hidrólise ideal para o Triptofano devido à sua boa estabilidade durante o processo. Para este processo utiliza-se o LiOH (hidróxido de lítio) a uma concentração de 4 N, colocada em estufa a 110 °C, por 22 horas.

#### *Oxidação:*

Ao determinar a concentração da cistina e da metionina de peptídeos, normalmente é feita a oxidação para ácido cystéico e metionina sulfônica, respectivamente, por meio de tratamento com ácido perfórmico em excesso, que posteriormente será destruído ao se adicionar o ácido bromídrico. Utiliza-se 9 mL de ácido fórmico a 88% e 1 mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) a 30%. Após repouso em temperatura ambiente durante 60 minutos, colocar em banho de gelo e utilizar imediatamente.

### Cromatografia por Troca Iônica

Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é altamente carregada (positiva ou negativamente), sendo que solutos com cargas e sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subseqüentemente eluídos (voltam à solução), por deslocamentos de outros íons com maior afinidade pela fase estacionária. Desta forma, os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador (fase estacionária) e os íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia. Esta diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido às diferenças de cargas, sendo possível controlá-la (a afinidade) utilizando fatores como o pH e a força iônica. O pH influencia no estado de ionização dos aminoácidos. De modo que ao se aproximar dos valores pH próximos ao ponto isoelétrico destes, eles se desprendem da fase estacionária e são eluídos para a fase móvel da coluna cromatográfica.

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. Quanto ao material são classificadas de orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas, e dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz são classificados em aniônicos ou catiônicos. Por serem mais eficientes geralmente são empregadas resinas orgânicas sintéticas altamente polimerizadas, como as resinas sulfonadas produzidas pela condensação de fenóis com formaldeído.

Resumidamente, o processo de separação realizado pela técnica pode ser descrito da seguinte forma: inicialmente o trocador iônico (fase estacionária) está em equilíbrio com o eluente inicial (solução inicial) contendo determinados íons ligados fracamente a esta fase. Adiciona-se então a amostra pré-tratada com os aminoácidos na forma livre, estes aminoácidos têm maior afinidade pelo trocador iônico e se ligam a este deslocando íons da solução eluente inicial. Após esta etapa são adicionados seqüencialmente vários eluentes (soluções), com determinados íons de afinidade um pouco maior pelos grupos trocadores da matriz, desprendendo gradualmente os aminoácidos com cargas. Após a separação, a coluna cromatográfica é regenerada, adicionando a solução eluente inicial num volume de 5 a 10 vezes superior à sua capacidade de retenção do íon (presente no eluente), para compensar a baixa afinidade deste em comparação com os que estão adsorvidos ao trocador.

Um detalhe neste tipo de cromatografia se refere ao tempo de duração. A força iônica pode ser variada (em função da concentração de íons no eluente) para se obter uma eluição mais lenta ou mais rápida dos aminoácidos. Aumentando a força iônica aumenta-se a competição e reduz a interação entre o grupo trocador e as substâncias-amostra (aminoácidos neste caso), que desta forma são eluídas.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLAE ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) é o mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. A HPLC utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados.

É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob alta pressão. Por este motivo também é chamada de Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Este tipo de cromatografia tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma gama de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

Inicialmente a matriz utilizada na HPLC foi a de estireno cruzado com divinilbenzeno, devido a sua multifuncionalidade e eficiência. No entanto, estas resinas têm a desvantagem de possuírem baixa resistência à deformação sob alta pressão, e por dificultarem a difusão das moléculas da substância-amostra para o interior do trocador. Devido a este fato, a matriz utilizada atualmente é rígida revestida por este material de estireno-divinilbenzeno, ou silicone, ou ainda de fluorcarbono e derivatizado (modificado, formando uma espécie de composto misto) com grupos trocadores sulfônicos ou amônio quartenário.

A diferença desta cromatografia de alta eficiência para as demais cromatografias líquidas (como a iônica) é devido à maior automatização do processo. Na CLC (Cromatografia Líquida Clássica) o recheio da coluna é feito uma vez para cada separação (porque parte da amostra é adsorvida de forma irreversível ao trocador), esta repetição representa um desperdício enorme de material e de mão de obra. A vazão do eluente na CLC é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas manualmente ou através de um coletor de frações. Demandando desta maneira mais tempo e custos. Na HPLC emprega-se uma coluna fechada e reaproveitável, portanto centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Outra característica é o sistema de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar com uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada resultando desta forma em resultados mais reproduzíveis, precisas e de maior valor científico. A injeção da amostra também é precisa e rápida utilizando uma

micro seringa de pressão (até 50 bar) ou utilizando uma válvula de injeção para os equipamentos mais modernos.

A análise quantitativa pela HPLC pode atingir uma precisão superior a  $\pm 0,5\%$ . Desta forma a análise qualitativa e quantitativa é levada a um alto nível de reprodutibilidade, exatidão e precisão.

### **Pós-Coluna**

Após a passagem pela coluna, para ser realizada a leitura pelo detector espectrofotométrico é necessário que haja uma reação com um corante específico. O corante geralmente mais utilizado é a ninhidrina, numa solução de 1:1 tampão de ninhidrina e citrato de sódio.

Em relação aos detectores é necessário que a instrumentação apresente uma série de características desejáveis. Para um detector "ideal" poderíamos listar: alta sensibilidade e baixo limite de detecção; resposta rápida a todos os solutos; insensibilidade a mudanças de temperatura e na vazão da fase móvel; resposta independente da fase móvel; pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector; resposta que aumente linearmente com a quantidade de soluto; não destruição do soluto; segurança e conveniência para uso; e informação qualitativa do pico desejado. Infelizmente não existem detectores com todas as características, mas os detectores atuais procuram abranger a maior parte delas.

Existe uma série de detectores no mercado atualmente, os mais utilizados são: espectrometria UV-visível, fluorescência, por índice de refração, eletroquímico (eletrodo de Hg gotejante), condutibilidade elétrica.

### **Problemas na determinação de aminoácidos**

A análise nem sempre se mostra exata e precisa para todos os casos e para todos os aminoácidos a serem determinados. Para os aminoácidos cistina (cisteína), prolina, serina, treonina, metionina, triptofano, asparagina e ácido glutâmico (glutamato) ocorrem perdas de até 30%. Prolina e serina em meio ácido reagem com água formando hidroxilamina que pode ser confundida com alanina. Cistina (cisteína) na presença de oxigênio em meio ácido formam um complexo cisteína-cistina-ácido cistéico, além de formarem pontes de enxofre não permanecendo na forma livre necessária para a análise. Para evitar este tipo de evento é necessária conversão para ácido cistéico e minimizar a presença de oxigênio. Outro caso de influência do oxigênio é na determinação da metionina, ocorrendo a formação de complexos sulfônicos ou sulfóxidos. Para a eliminação do oxigênio é realizado o tratamento a vácuo com nitrogênio gasoso puro, ou protegida (a metionina) com fenol a 1%.

### **NIRS – Espectroscopia de Reflectância do Infravermelho Próximo**

A espectroscopia do infravermelho próximo (Near Infrared Reflectance Spectroscopy - NIRS) é um método rápido e não destrutivo de análise que requer mínima preparação de amostra para análise. Este método foi utilizado primariamente para prever o valor nutritivo de forragens em 1976. O método NIRS foi aprovado pelo AOAC (Worldwide Confidence in Analytical Results) como método de mensuração de matéria seca, teor de nitrogênio total e fibra em detergente ácido. Laboratórios de análise de forragens, nos EUA e Europa, têm utilizado o NIRS para realizar análises de rotina em feno, silagens e grãos, avaliando os teores de proteína bruta, FDN, FDA, Ca, P, K e Mg. A precisão do método NIRS é dependente da calibração realizada a partir de amostras representativas da população e do método tradicional utilizado para tal calibração.

O infravermelho próximo é definido como a parte do espectro eletromagnético situado entre 700 e 2500 nm. A tecnologia NIRS se baseia na existência de relações entre as características físicas, químicas e sensoriais de um produto e a absorvância a comprimentos de onda específicos na região do "infravermelho próximo". Consiste em essencialmente na emissão de um feixe de luz sobre a amostra, a qual em função de sua composição, ou melhor, da natureza das ligações, absorverá uma determinada quantidade de energia em cada um dos comprimentos de onda. Posteriormente, estes dados são utilizados para determinar parâmetros de qualidade de um produto tais como composição química, propriedades físicas, características sensoriais, níveis microbiológicos, etc.

A base do sistema NIRS é a determinação da reflectância em comprimentos de onda específicos dentro da faixa do infravermelho próximo (750 – 2500 nm) e relacionar o grau de reflectância a um composto ou elemento específico. Os comprimentos de onda do infravermelho próximo são absorvidos principalmente por:

- Ligações C-H - comuns em carboidratos;
- Ligações N-H - comuns em proteínas, amidas, e aminoácidos;
- Ligações O-H - comuns em moléculas de água.

Se o comprimento de onda da radiação for compatível com a frequência de rotação ou vibração da ligação química dentro de um composto em particular, ele é absorvido.

Procedimentos estatísticos são utilizados para correlacionar a reflectância de um ou mais comprimentos de onda ao verdadeiro nível de um composto ou nutriente mensurado por um método de calibração. A equação de regressão é desenvolvida para estimar a quantidade de um composto ou nutriente baseado no poder de reflectância destes comprimentos de onda. Esta equação é então inserida em um software utilizado pelo NIRS para futuras análises, sem que o uso dos métodos químicos seja necessário novamente para aquele mesmo alimento, por exemplo.

Porém, a produção de equações estatísticas significantes e com alto grau de correlação ( $R^2 > 0,90$ ) não tem sido comum para nutrientes que não o N (nitrogênio). Então, sempre são relacionados, indiretamente, comprimentos de onda refletidos a um nutriente ao invés de se fazer relações diretas entre estes. Isto resulta em mais baixas correlações entre os valores dos nutrientes encontrados pelo NIRS (com exceção de N) em comparação aos valores das análises de compostos orgânicos alcançados por análises laboratoriais tradicionais, que normalmente exibem coeficientes de correlação de determinação altos ( $R^2 > 0.95$ ), porque eles estão diretamente envolvidos às ligações C-H, N-H e O-H.

A análise quantitativa implica no desenvolvimento de equações de calibração, mediante estabelecimento de relações matemáticas entre os valores espectrais e dados obtidos por um método de referência. Por exemplo, o uso de uma determinada tecnologia de controle de qualidade instantânea permite ao setor de fabricação das rações a caracterização (% umidade, % proteína, % gorduras, % fibra, etc.) tanto de matérias-primas como do produto final.

A tecnologia NIRS, frente a outros tipos de técnicas de análise, apresenta numerosas vantagens destacando fundamentalmente sua rapidez, versatilidade, e sobretudo, por sua economia, já que possibilita importante diminuição nos custos analíticos para as empresas.

O sucesso dessa técnica depende da especificidade e concentrações dos analitos, precisão do método convencional utilizado na calibração e do grau com o qual as amostras escolhidas para a calibração representam à população a ser predita. Os aparelhos corretamente calibrados são capazes de realizar rapidamente muitas

determinações ao mesmo tempo. Os maiores problemas do método NIRS incluem o alto custo de maquinário de espectroscopia de alta precisão, dependência de métodos laboriosos e muitas vezes inexatos para monitoração dos procedimentos, além da falta de sensibilidade para constituintes menores. Os avanços no desempenho dos instrumentos aumentaram a precisão espectral e a consistência entre as informações entre diferentes aparelhos. Softwares mais avançados aumentaram a produção de dados a partir do espectro, aumentaram o entendimento dos operadores quanto às limitações das equações de calibração e habilidade para monitorar os resultados analíticos de instrumentos em locais remotos, através da rede NIRS.

O NIRS oferece a melhor forma de reduzir o custo de análises e de prover resultados mais rápidos e confiáveis. Estudos prévios demonstraram que o NIRS pode ser usado para mensurar os teores de aminoácidos em grãos grosseiramente moídos, mas existe uma grande necessidade das indústrias de rações em determinar se isto poderia ser feito com grãos inteiros, o que seria de extrema importância para análise de recepção de grãos nas fábricas de rações.

O NIRS pode prever o conteúdo de proteína bruta de forma mais confiável do que equações de regressão. Devido ao baixo custo operacional (por amostra) e rapidez as análises com o método NIRS possibilitam a análise de muitas amostras. Isto possibilita melhorar a precisão na formulação de rações e obter melhor qualidade destas e custos de produção mais baixos.

### **Métodos Alternativos de Determinação**

Além dos métodos supracitados, ainda existem outros tipos de avaliação do conteúdo aminoacídico das amostras. Estes métodos exigem um nível menor de tecnologia e ainda apresentam a vantagem de serem de menor custo, entretanto, ainda carecem de precisão e exatidão.

#### **Eletroforese capilar**

A eletroforese é uma técnica baseada na diferença de velocidade (e, portanto na mobilidade) ao ser submetido à ação de um campo elétrico. Esta técnica foi introduzida por Tiselius em 1937 com a finalidade de separar proteínas, onde se observou que ao se colocar uma mistura de proteínas dentro de um tubo cheio de solução tampão e aplicado um campo elétrico, cada proteína migrava de forma distinta.

A atual Eletroforese Capilar (CE) possibilita análises com alta eficiência e resolução, rápidas e necessidades mínimas de solventes e amostra. A separação por eletroforese é obtida pela migração diferencial de solutos (aminoácidos, no caso) num campo elétrico dentro de tubos capilares muito finos (diâmetro entre 25 e 75  $\mu\text{m}$ ) preenchidos com solução tampão. A migração dos componentes a serem analisados é diferenciada em função da sua carga, com a velocidade diretamente proporcional à carga, e do seu raio (tamanho da molécula) com a velocidade inversamente proporcional ao seu tamanho. A alta resistência elétrica dos capilares permite a aplicação de campos elétricos muito altos (de 100 a 500 Volts/cm) com uma geração de calor mínima, em função da grande razão área:volume do capilar que dissipa eficientemente o calor gerado. A introdução da amostra (pré-preparada) é feita na própria solução tampão (uma solução específica para cada aminoácido que se queira analisar, semelhante à cromatografia de troca iônica), sendo a leitura realizada dentro dos capilares através de detectores semelhantes aos da HPLC como os de espectrometria do UV-visível e por fluorescência.

### **Métodos biológicos de determinação de aminoácidos**

Os métodos biológicos de determinação ao contrário dos métodos químico-analíticos, apenas podem ser utilizados para a determinação da biodisponibilidade de aminoácidos considerados essenciais aos organismos. Tais métodos ainda podem ser divididos em biológicos e microbiológicos, onde nos primeiros são utilizados organismos mais complexos na técnica (como ratos e camundongos de laboratório), e no segundo são utilizados organismos unicelulares.

### **Métodos microbiológicos – ensaios com microorganismos**

Três exigências básicas devem ser satisfeitas para a aplicação de métodos microbiológicos na quantificação de aminoácidos. Deve haver a existência de um microorganismo para qual o aminoácido analisado seja indispensável, que o crescimento do microorganismo em resposta à concentração do aminoácido seja linear, e ainda que haja um método adequado para medir a resposta de crescimento do microorganismo em função da concentração do aminoácido no meio de cultura.

No meio basal de desenvolvimento deve haver excesso de todos os nutrientes exigidos pelo microorganismo, exceto o aminoácido que se deseja pesquisar. Em seguida é construída uma curva-padrão de crescimento em que o aminoácido essencial é adicionado em quantidades crescentes. Para a confecção da curva de crescimento podem se utilizar os seguintes indicadores como medida do desenvolvimento do microorganismo: volume ou peso das células formadas durante o período de incubação, contagem do número de células por unidade de volume da suspensão, medida da turbidez do meio de cultura, ou ainda a concentração de um metabólito qualquer do microorganismo. Tendo-se a curva-padrão, pode-se determinar a concentração do aminoácido em questão em uma amostra que se queira analisar. As bactérias mais utilizadas neste método são a *Streptococcus zynogenes*, que é utilizada na determinação de arginina, histidina, leucina, isoleucina, metionina, triptofano e valina; e *Streptococcus faecalis*, utilizada na determinação de lisina e treonina.

### **Métodos biológicos – ensaios com animais**

Este tipo de procedimento é bastante semelhante ao ensaio microbiológico. Na razão base da técnica é necessário que haja o fornecimento de alimentos ricos em todos (ou a maioria) dos nutrientes e pobres no aminoácido que se deseja estudar. Desta forma é construída uma curva-padrão adicionando doses crescentes deste aminoácido livre (na forma L) à dieta base.

Para a confecção da curva-padrão de lisina biodisponível em qualquer material pode-se utilizar como fonte de proteína na dieta base o glúten de milho e glúten de trigo. Para triptofano podem-se utilizar misturas de gelatina e zeína (proteína do milho), ainda para triptofano e metionina pode ser utilizada a caseína oxidada com ácido perbórico, destruindo completamente o triptofano e transformando a metionina em sulfonada na forma indisponível.

Em comparação com o ensaio microbiológico os biológicos utilizando cobaias (ratos) são mais demorados e exigem maior infra-estrutura e maior quantidade de ingredientes e mão de obra, conseqüentemente aumentando o seu custo.



### Considerações Finais

As análises instrumentais de aminoácidos vieram atender uma demanda antiga de vários pesquisadores, possibilitando avaliar os valores destes componentes nos alimentos de forma rápida, precisa e exata.

São indiscutíveis os avanços que esses métodos trouxeram à análise de alimentos. Não só a rapidez e a economia de mão-de-obra, mas também a redução da poluição ambiental e redução nos gastos com reagentes. Mas apesar deste fato, alguns pontos devem ser levados em consideração quando da aquisição desse tipo de maquinário de análise.

O custo desse tipo de maquinário (sejam cromatógrafos mais modernos – HPLC - ou mesmo a aparelhagem do sistema NIRS). Além do alto custo de aquisição, esses aparelhos demandam uma mão-de-obra especializada, tanto na operação do equipamento quanto em sua manutenção. Esse fato pode inviabilizar a aquisição desse tipo de maquinário, visto que as peças internas de um equipamento de HPLC, por exemplo, podem chegar à casa de algumas centenas de dólares. Outro problema são as possíveis falhas na alimentação desses aparelhos com dados viciados, no caso do NIRS, ou com informações no mínimo duvidosas, como é o caso dos analitos pós-digestão/oxidação, no caso da cromatografia.

Esse tipo de aparelhagem é capaz de fornecer respostas satisfatórias, desde que respeitadas suas limitações, e seriam interessantes no setor de recepção de fábricas de rações, visto que com a calibração bem feita, com o auxílio desse tipo de aparelhagem é possível que se evite o uso de insumos de qualidade inferior evitando, desta forma, problemas posteriores advindos do consumo de rações problemáticas.

### Referências Consultadas

BARTON II, F. E., Theory and Principles of Near Infrared Spectroscopy. Spectroscopy Europe. V. 14, Nº 1, p. 12-18, 2002

BLATT, C. Evolução da Eletroforese Capilar. Anais Seminário sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e outros Materiais Biológicos, 1994.

CAMPESTRINI, E. Utilização de Equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos Estudos de Valores Nutricionais (Composição Química e Digestibilidade) de Alimentos para Não Ruminantes. Revista Eletrônica Nutritime, v.2, nº5, p.235-246, setembro/outubro 2005. Retirado de <<http://www.nutritime.com.br>> em 18/11/2005.

COLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, 1994.

CORASSA, A.; MAGALHÃES, S.; COSTA, L. F.; BRITO, C. O. Procedimentos Práticos para Análise de Aminoácidos. In: Determinação de Proteína em Alimentos para Animais. Métodos Químicos e Físicos. Editora UFV. 2005.

FONTAINE, J., SCHIRMER, B., HERR, J prediction of essential amino acid contents. 2. Results for wheat, barley, corn, triticale, wheat bran/middlings, rice bran, and sorghum. Retirado de <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>> em 19/11/2005.

GARRIDO, A. Avances en la utilización e la tecnología nirs. aplicaciones en producción animal. Xix Curso De Especialización FEDNA. MADRID, 23 e 24 de Outubro de 1996.

GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, 1994.

Introduction to NIR Technology, Retirado de <[www.asdi.com](http://www.asdi.com)> em 18/11/2005.

KAZAKEVICH, Y., MC NAIR, H. BASIC LIQUID CHROMATOGRAPHY. 1996 Retirado de <[http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/)> em 18/11/2005.

Measuring Amino Acids in Western Canadian Hulled and Hulless Barley. Alberta Grain Commission's - Government of Alberta. Retirado de <<http://www1.agric.gov.ab.ca/>> em 19/11/2005.

MUELLER-HARVEY, I. Modern techniques for feed analysis. Assessing quality and safety of animal feeds. Retirado de <<http://www.fao.org/>> em 19/11/2005.

NIRS Analyses – Chapter 9. American Soybean Association. Retirado de [www.asa-europe.org/](http://www.asa-europe.org/) em 19/11/2005.

PICKERING LABORATORIES. Application Manual Amino Acids. Mountain View, Califórnia-USA. Press, INC., 2002.

SALIBA, E. O. S., GONTIJO NETO, M.M., RODRIGUEZ, N.M. et al. Prediction of sorghum chemical composition by near infrared spectroscopy technique. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., June 2003, vol.55, no.3, p.357-360.

SCAPIM, M. R. S. et al., Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. Acta Scientiarum - Animal Sciences. Maringá, v. 25, Nº 1, p. 91-98, 2003.

SCARBIERI, V. C. Métodos Biológicos de Determinação de Aminoácidos. Anais Seminário sobre Análise de Aminoácidos em Alimentos e outros Materiais Biológicos, 1994.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análisis Instrumental. 5ª ed., McGraw-Hill, cop. 2002.