

Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne

Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat

RIALA6/972

Jussara C. de M. DELLA TORRE^{1*}, Jaim LICHTIG¹, Nelson J. BERAQUET²

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz - Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos - Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP. CEP: 01246-902.

¹ Serviço de Alimentos da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz

² Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Av. Brasil, 2880, Campinas, SP. CEP: 13073-001.
Recebido: 01/12/2003 – Aceito para publicação: 14/05/2004

RESUMO

A validação tem por objetivo assegurar que o método analítico é adequado ao que se propõe quantificar e pode ser realizada por estudos interlaboratoriais ou intralaboratoriais. A exatidão é um dos principais fatores a serem estabelecidos na validação, podendo ser avaliada com o uso de materiais de referência. Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados na quantificação do aminoácido hidroxiprolina na rotina de análise de tecido colágeno devido à precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez. Este trabalho teve por objetivo validar intralaboratorialmente a metodologia espectrofotométrica oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para quantificação do aminoácido hidroxiprolina utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom) como material de referência. A curva de padronização apresentou linearidade ($r=0,9991$) na faixa utilizada. O método revelou limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise de $0,030 \mu\text{g/mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% e na amostra $0,0075\text{g}/100\text{g}$. As taxas de recuperação variaram de 90 a 95% determinadas em 3 níveis de concentração da amostra FAPAS fortificada. As taxas de repetitividade obtiveram CV (coeficiente de variação) inferiores a 4%. A participação em nove séries do programa interlaboratorial de proficiência FAPAS/MAFF/UK no período de 1997 a 2003 revelou boa exatidão com resultados satisfatórios em 89% das análises. A metodologia apresentou-se eficiente quando aplicada a conservas de carne, podendo ser considerada validada intralaboratorialmente.

Palavras-Chave. validação, hidroxiprolina, método espectrofotométrico, determinação quantitativa, colágeno, conserva de carne.

ABSTRACT

The purpose of validation approach is to assure the adequacy of an analytical method, and it may be performed by either inter - or intralaboratory studies. Accuracy is one of the main factors in the validation process, and it may be evaluated by employing reference samples. For hydroxyproline determination of collagen routine analysis, spectrophotometry methods are used due to the precision, accuracy, simplicity, low cost and rapidity. The present investigation aimed at the intralaboratory validation of the official AOAC (Association of Official Analytical Chemists) spectrophotometric determination of hydroxyproline in canned meat employing the FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom) as reference material. The calibration curve showed linearity ($r=0.9991$) in the applied concentration

interval. The method revealed quantification limit of 0.030 μ g/mL with relative standard deviation of 6.5%, and 0.0075g/100g for the sample. The recovery rates were of 90-95% for three spiked concentrations FAPAS samples. The repeatability rates displayed the CV (variation coefficient) below 4%. Participation in nine series of interlaboratory FAPAS/MAFF proficiency program, during the period between 1997 and 2003, revealed satisfactory results in 89% of evaluations. The method was considered efficient for canned meat analyses, and it may therefore be considered as intralaboratorially validated.

Key Words. validation, hydroxyproline, spectrophotometric method, quantitative determination, collagen, canned meat

INTRODUÇÃO

Com a implantação dos Programas de Qualidade nos Institutos de Pesquisa, tornou-se necessário a participação em programas interlaboratoriais e a validação de métodos analíticos. Através desses programas é possível auto-avaliar, comparar resultados obtidos usando diferentes técnicas analíticas, testar metodologias, avaliar o desempenho do laboratório e obter materiais de referência certificados. O "Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) - CSL Food Science Laboratory - Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), UK" tem sido o programa interlaboratorial de análise de alimentos mais utilizado no Reino Unido e em vários países do mundo⁵. Segundo o FAPAS⁸, com a finalização dos resultados, tendo-se estabelecido a concentração do analito, as amostras excedentes podem ser utilizadas como material "quase-referência", da mesma maneira que os materiais de referência certificados (CRMs). Materiais de teste FAPAS não são CRMs porém, como materiais certificados na área de alimentos são escassos, muitas vezes poderão ser a única fonte de referência disponível⁸.

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los¹⁴.

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico, podendo ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o analista pode validar um método analítico: a) comparação com um método independente; b) emprego de material de referência certificado. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Nota-se que o método escolhido que já foi objeto de um estudo colaborativo; ainda assim está obrigado a ser validado intralaboratorialmente para provar que pode ser usado no laboratório²⁷.

Validação é um conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento é adequado para a aplicação pretendida. A validação de um método analítico tem por objetivo o conhecimento de seu potencial aplicativo e de suas limitações, sendo essencial para a correta interpretação dos resultados obtidos na aplicação do método. O processo de validação tem o objetivo de explicar a repetitividade e a reprodutibilidade de um método, pela interpretação dos parâmetros que definem a exatidão e a precisão do mesmo. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea em idênticas condições em curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade difere da repetitividade por utilizar laboratórios, operadores e equipamentos diferentes, entre outros¹.

O processo de validação de um teste quantitativo exige além do conhecimento já mencionado da exatidão e da precisão, o conhecimento da especificidade, do limite de quantificação e da linearidade. O limite de detecção deverá ser estabelecido somente nas análises de impurezas e ensaios limite¹.

Os métodos de análise devem apresentar especificidade, pois os alimentos são de constituição química complexa, podendo seus componentes interferir nos resultados. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico¹⁴.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como, por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O termo "*limite de detecção*" não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais. O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito¹⁴.

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio¹⁴.

Linearidade é a habilidade das respostas analíticas serem diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em estudo^{1,19}. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante. O limite inferior deve ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. As etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos (*bias*). A linearidade da curva de calibração pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (*r*) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado livre de tendências (*unbiased*) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem¹⁴.

Os valores da curva analítica não devem apresentar valores aberrantes e devem apresentar homoscedasticidade. Homoscedasticidade ou heteroscedasticidade é a independência ou dependência da variância das respostas com as concentrações do analito. Se o valor da maior variância dividido pelo somatório das variâncias for menor que o tabelado de Cochran, o método é homoscedástico, e, portanto, a curva analítica pode ser construída pelo método dos mínimos quadrados normais¹.

O limite de quantificação é a mais baixa concentração do analito em exame que pode ser quantificada com limite de confiabilidade aceitável utilizando um determinado procedimento experimental¹. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado "limite de determinação". Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias.

Exatidão do método é definida como sendo a concordância dos valores experimentais com o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro¹. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação¹⁴. A taxa de recuperação é definida como a relação

entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito (*spike*), e o valor teórico desta quantidade fortificada¹. O analito deve ser adicionado à amostra em pelo menos três diferentes concentrações¹⁴. A faixa de variação de recuperação aceitável é de 70 a 110% e deve ser expressa para cada nível de concentração estudado¹.

A presença da hidroxiprolina no colágeno, representando aproximadamente 14% do mesmo, é uma característica particular da proteína porque este aminoácido ocorre somente em poucas proteínas, a saber, elastina (1,6%), e em menor extensão na proteína do complemento do soro (C1q), e em algumas proteínas vegetais²³. Por causa desta composição incomum, é grande o interesse no desenvolvimento de métodos acurados na quantificação deste aminoácido, que permite quantificar indiretamente o teor de colágeno.

Segundo a AOAC², a hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso em carne e produtos cárneos. O tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina quando o fator de conversão de nitrogênio a proteína 6,25 é utilizado, ou 14% quando o fator é 5,55.

A detecção e a determinação acurada de hidroxiprolina é um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que busca explicar a verdadeira contribuição do colágeno para a estrutura e qualidade da carne. Em geral, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade, devido à redução da sua maciez e valor nutricional²⁵, estando grande parte dos aminoácidos essenciais em proporção acentuadamente reduzida, e o triptofano comumente ausente³. O tecnólogo de alimentos também requer técnicas analíticas confiáveis para auxiliar no controle de qualidade de um produto uniforme, que também esteja de acordo com a legislação vigente quanto à sua composição. Dependendo da natureza da investigação e da amostra, há vários métodos para a detecção de proteínas colagenosas do tecido conjuntivo e quantificação do aminoácido hidroxiprolina, a saber: **a)** espectrometria de ressonância magnética nuclear¹⁷, **b)** técnica ELISA para a determinação dos vários componentes do tecido conjuntivo⁷; **c)** métodos histoquímicos^{9,10,13,26}, **d)** cromatografia em fase gasosa com detector de massa¹⁵, **e)** cromatografia líquida de alta eficiência²⁴; **f)** espectroscopia de transmissão no infravermelho próximo⁴; **g)** análise de aminoácidos^{12,21,28,29} e **h)** espectrofotometria ou colorimetria^{11,16,18,20,22}. Alguns dos métodos citados podem ser tão bons quanto os colorimétricos, contudo muitos deles necessitam operadores e equipamentos especializados resultando custo elevado, não sendo apropriados para um grande número de amostras⁷.

Na determinação espectrofotométrica da concentração de hidroxiprolina, a amostra é inicialmente hidrolisada com ácido para liberar a hidroxiprolina da ligação peptídica. Isto é geralmente alcançado com H₂SO₄ 3,5M a 105°C por 16h em tubos fechados ou com HCl 6M a 110°C por 8-24h sob refluxo. O aminoácido livre é determinado colorimetricamente após oxidação a pirrol (Figura 1) e reação com 4-

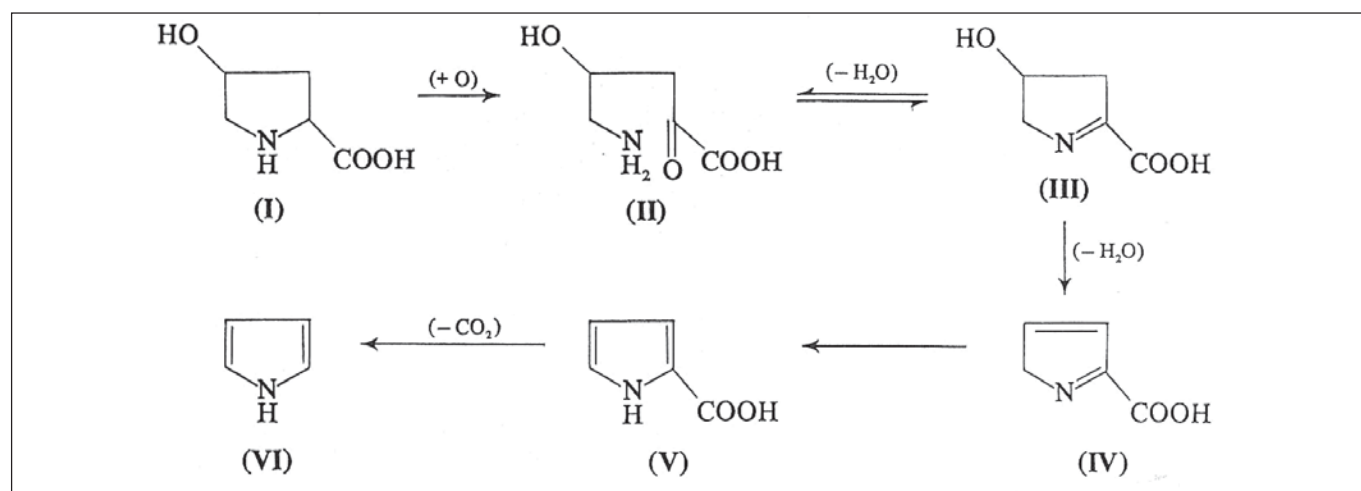


Figura 1. Mecanismo proposto para a oxidação da hidroxiprolina a pirrol. Hidroxiprolina (I) é oxidada inicialmente a ácido α-ceto-γ-hidroxi-δ-aminovalérico linear (II), o qual está em equilíbrio com a estrutura cíclica de ácido Δ'-pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico (III). A perda da molécula de água resulta uma estrutura instável (IV) a qual, espontaneamente, através de rearranjo, resulta em ácido pirrol-2-carboxílico (V). A etapa final de descarboxilação a pirrol (VI) ocorre durante o aquecimento após a adição do reagente cromogênico, 4-dimetilaminobenzaldeído⁷.

dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich) resultando um composto de coloração vermelho-púrpura. A cloramina T é atualmente o agente oxidante preferido na formação do pirrol.

Na existência de uma legislação que estabeleça teores máximos de proteína do tecido conjuntivo colagenoso em carnes e produtos cárneos, o teor de colágeno deve ser determinado com segurança, havendo a necessidade de métodos de análise de rotina que sejam simples, confiáveis e suficientemente rápidos.

No Brasil, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas desconhecem-se relatos sobre a validação de métodos para a quantificação do aminoácido hidroxiprolina.

O objetivo do presente trabalho foi validar intralaboratorialmente o procedimento de análise quantitativa na determinação do aminoácido hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico oficial preconizado pela AOAC², utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras

Para a validação do método utilizaram-se amostras de conservas de carne esterilizadas (Figura 2) de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK. As amostras denominadas “canned meat test material” foram analisadas quanto aos teores de hidroxiprolina, no período de 1997 a 2003, correspondendo essas análises à participação do Laboratório em 9 séries (“Rounds”) do programa interlaboratorial. De acordo com os procedimentos do FAPAS, o material teste constituiu-se de

porcentagens variáveis de carne suína, toucinho, farinha de rosca, água e sal que foram homogeneizados em “cutter”, envasados a vácuo em latas cilíndricas de aproximadamente 150g e autoclavados a um tempo de esterilização (F_0) pré-estabelecido.

Padrão

Foi preparada uma solução padrão de hidroxiprolina em água (Merck, para fins bioquímicos) na concentração de 839 μ g/mL, por pesagem direta de 0,1678g em 200mL de água destilada.

Reagentes

Os solventes orgânicos n-propanol e 2-propanol utilizados foram de grau espectrofotométrico; os demais reagentes utilizados foram de grau pureza analítica.

Equipamentos

Trabalhou-se com espectrofotômetro ultravioleta e visível (HP-8453 gerenciado pelo software UV-VIS Chemstation), balança analítica (Bosch SAE200), pHmetro digital (Hanna HI 93321), banho-maria termostatizado a 60°C (Fanem - Unitemp).

Métodos

Procedimento de análise quantitativa

A determinação da hidroxiprolina seguiu metodologia preconizada pela AOAC² e estabelecida por Della Torre et al.⁶, onde a amostra (4,00g) foi hidrolisada sob refluxo com 30 mL de ácido clorídrico 6M por 8h a 110°C, filtrada e diluída. A hidroxiprolina foi oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0 (temperatura ambiente, 20 minutos). O pirrol com o reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol) a 60°C por 15 minutos forma um

complexo vermelho-púrpura, que, segundo a metodologia oficial, deve ser medido a 560nm. Neste estudo, o estabelecimento do comprimento de onda de máxima absorção foi obtido através da varredura espectrofotométrica de uma solução padrão de hidroxiprolina, diluída a 0,030µg/mL, submetida ao procedimento acima. A quantificação das amostras realizou-se pelas interpolações dos resultados de absorbância colocadas na equação de regressão linear da reta padrão.

Linearidade

A linearidade foi observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) da curva analítica, das soluções padrão de hidroxiprolina, tratadas pelo procedimento, distribuídas uniformemente no intervalo de trabalho¹⁴.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido como o padrão de calibração da curva analítica de menor concentração (excluindo o branco) medido de forma quantitativa com nível aceitável de precisão e exatidão¹⁴.

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente ao teste de linearidade e expressa pelo coeficiente angular da curva de calibração, sendo dependente da natureza do analito e da técnica de detecção¹⁴.

Recuperação

A amostra de conserva de carne obtida em estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF ("Round 25") foi previamente avaliada para o teor do aminoácido hidroxiprolina. Os testes de recuperação foram realizados com a adição de 5, 10 e 20

mL de solução padrão de hidroxiprolina na concentração de 839 µg/mL à amostra FAPAS, em triplicata, a fim de se obter os níveis de concentração de hidroxiprolina na alíquota de análise de 0,280 (metade da concentração determinada da amostra de conserva FAPAS); 0,559 (igual) e 1,119 µg/mL (dobro). A recuperação foi calculada pela relação entre a concentração determinada e a teórica (adicionada no início do procedimento) após seguir o procedimento analítico completo¹.

Precisão

Repetitividade

O estudo da repetitividade abrangeu a determinação de hidroxiprolina de amostras de conserva carne (FAPAS, "Round" 25), adicionadas de padrão hidroxiprolina (839µg/mL) nos três níveis de concentração (dobro, igual e metade da concentração esperada), em triplicata. A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre as replicatas nos níveis de concentração de adição do padrão, através do coeficiente de variação (%CV). As determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista¹.

Exatidão

A exatidão do procedimento analítico de quantificação de hidroxiprolina foi expresso pelo valor-z, representando grau de concordância entre os resultados laboratoriais individuais encontrados e os valores aceitos como referência nos estudos de análise de controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (resultados FAPAS), no período de 1997 a 2003.

Tratamento estatístico dos dados

Determinação de valores aberrantes

Na verificação se o menor e/ou maior valor era aberrante ou se não fazia parte da população de valores gerados durante as etapas de validação do método, utilizou-

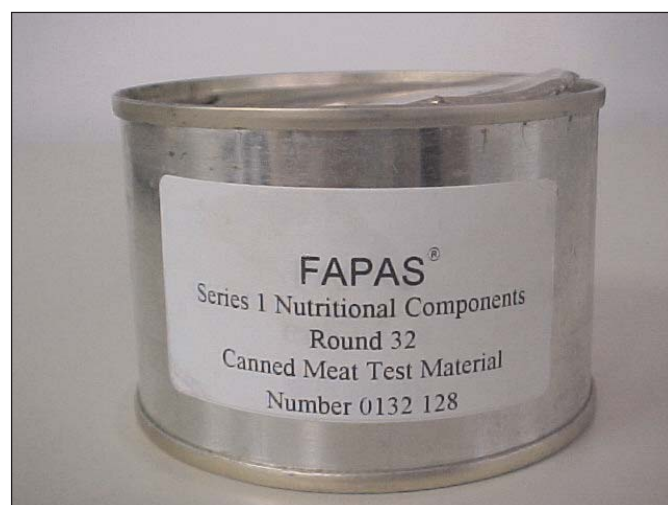


Figura 2. Amostra de conserva de carne para estudo de controle interlaboratorial FAPAS na quantificação de hidroxiprolina

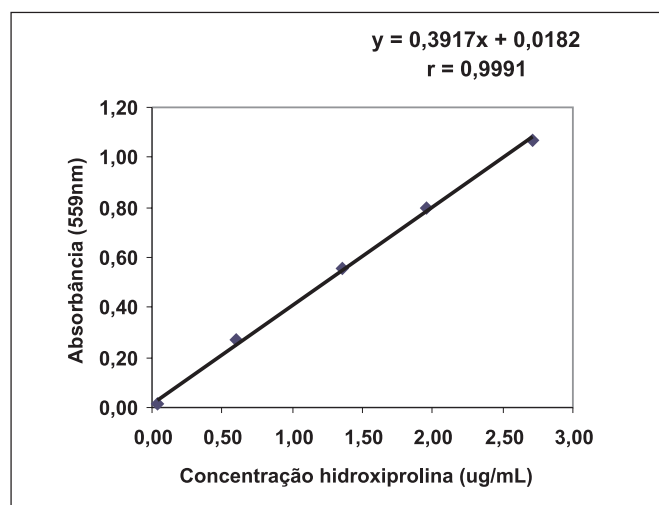


Figura 3. Curva analítica de determinação do aminoácido hidroxiprolina

Tabela 1. Resultados da análise das soluções padrão de hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico AOAC².

Solução padrão Hidroxiprolina* (µg/mL)	Absorbância (559nm)	DP	CV(%)	Variância
0,030	0,014	0,001	6,5	0,0000009
0,604	0,268	0,003	1,2	0,0000096
1,359	0,558	0,015	2,7	0,0002260
1,963	0,794	0,010	1,2	0,0000940
2,718	1,071	0,014	1,3	0,0001930

* Análises realizadas em quadruplicata DP = desvio padrão CV=coeficiente de variação

Tabela 2. Taxas de recuperação dos padrões de hidroxiprolina adicionados em amostras de conserva de carne FAPAS.

Níveis	Concentração (alíquota) adicionada* (µg/mL)	Concentração (alíquota) determinada (µg/mL)	Concentração média determinada (µg/mL)	DP	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	CV(%)
I	0,28	0,27 0,25 0,26	0,26	0,01	96,4 89,3 92,9	92,9	3,6	3,9
II	0,56	0,53 0,52 0,54	0,53	0,01	94,6 92,8 96,4	94,6	1,8	1,9
III	1,12	1,01 1,02 1,01	1,01	0,01	90,2 91,1 90,2	90,5	0,5	0,6

* Análises realizadas em triplicata DP = desvio padrão CV = coeficiente de variação

Tabela 3. Resultados das participações no controle interlaboratorial FAPAS

N	Ano	“Round”	Resultado laboratório*(%)	Resultado FAPAS(%)	Valor z
1	1997	18	0,073	0,067	0,3
2	1998	20	0,165	0,168	-0,1
3	1998	22	0,176	0,166	0,2
4	1999	25	0,209	0,198	0,2
5	2000	27	0,216	0,203	0,2
6	2001	30	0,112	0,135	-0,7
7	2002	32	0,177	0,202	-0,5
8	2002	34	0,181	0,187	-0,5
9	2003	35	0,114	0,133	-2,2

*Análises realizadas em triplicata

se o teste de Grubbs para o nível de significância de 0,05. O valor y_{ij} foi considerado aberrante quando G calculado era maior ao tabelado em função do número de replicatas (n), conforme a equação¹:

$$G = (y_{ij} - \bar{y})/s$$

Onde:

y_{ij} = valor suspeito de ser aberrante

\bar{y} = média dos valores obtidos

s = desvio padrão dos valores obtidos

Valores tabelados: n=3, $G_{tab} = 1,15$; n=4, $G_{tab} = 1,48$; n=5, $G_{tab} = 1,72$

Homoscedasticidade/heteroscedasticidade

A homoscedasticidade foi avaliada através do método de Cochran¹, em quadruplicata para os 5 pontos da curva analítica (0,030 – 2,718 µg/mL), calculando-se as variâncias das respostas de absorbância de cada ponto de concentração, dividindo-se a

maior variância (S^2) pela somatória das variâncias ($\sum S^2$) e comparação do valor obtido com o valor tabelado, segundo a fórmula: $c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de hidroxiprolina segundo método AOAC², aplicando-se o procedimento a um padrão diluído, revelou um pico máximo de absorvância no comprimento de onda de 559nm. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de absorvância, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e variância obtidos na análise das soluções padrão de hidroxiprolina para as cinco diferentes concentrações, utilizadas na elaboração da curva analítica.

A determinação da homoscedasticidade / heteroscedasticidade verificada através do método de Cochran ($c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$) revelou c_{cal} igual a 0,525 para os resultados de variância estabelecida na Tabela 1. Como c_{cal} é menor que c_{tab} (0,684 para 5 pontos) concluiu-se que o método é homoscedástico. Como o critério de homoscedasticidade foi cumprido, a curva de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos, revelando a equação da reta $y=0,3917x+0,0182$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991 (Figura 3). Desta forma fica estabelecido a linearidade da curva analítica pela proximidade de r ao valor 1 e a sensibilidade de 0,3917 mL μg^{-1} expressa pela inclinação da curva de regressão linear (coeficiente angular da reta).

O limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise ficou definido como 0,030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% (Tabela 1) e de 0,0075g/100g de hidroxiprolina na amostra. A curva analítica abrangeu de 0,030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2,718 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidroxiprolina, limite superior com desvio padrão relativo de 1,3%.

As taxas de recuperação de hidroxiprolina das amostras de conservas de carne FAPAS adicionadas de padrão em 3 níveis de concentração, foram calculadas pela relação entre a concentração média determinada e a concentração média teórica (adicionada) para cada nível de concentração estudado (Tabela 2). Os resultados revelaram as taxas de recuperação de 92,9, 94,6 e 90,5%, respectivamente, para as concentrações finais teóricas metade, igual e dobro. A recuperação média de 92,7%, embora ligeiramente inferior a 96,1%, obtida no estudo colaborativo de Kolar¹⁸, mostra-se dentro do intervalo aceito 70 – 110%¹. A repetitividade expressa pela dispersão dos resultados entre replicatas através do coeficiente de variação, revelou valores de CV inferiores a 3,9%. Não houve suspeitas de valores aberrantes.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos ensaios de exatidão realizados com nove amostras de conservas de carnes de estudos interlaboratoriais de proficiência FAPAS/MAFF/UK, no período de 1997 a 2003. No relatório final que retornou aos laboratórios participantes, ficou estabelecido o valor-z (“z-score”) da análise para cada laboratório, onde $z=(x-X)/\sigma$; x=concentração do analito determinada, X=concentração

verdadeira do analito, σ =desvio-padrão para o valor x, podendo-se considerar o resultado satisfatório se $|z|<2$, questionável quando $2<|z|<3$ e insatisfatório se $|z|>3$. Os valores-z variaram de -2,2 a 0,3 no período avaliado. Pode-se considerar que 89% (8 em 9) dos resultados foram satisfatórios, por apresentarem valores de |z| menor que 2. Somente 11% (1 em 9) dos resultados revelaram |z| entre 2 e 3, podendo ser considerados questionáveis. Não houve resultado insatisfatório ($|z|>3$). O controle de qualidade do método no laboratório está sendo verificado anualmente pela introdução de amostra de referência FAPAS para análise.

CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico preconizado pela AOAC para quantificação de aminoácido hidroxiprolina, através da hidrólise ácida das proteínas, oxidação com cloramina T e reação colorimétrica com reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído), foi confirmado ser simples na operação, rápido, adequado para um grande número de amostras, revelando elevada exatidão e precisão em matriz complexa como conservas de carne.

REFERÊNCIAS

1. Abrantes, S.M.P. **Curso de validação de metodologia na área química**. In: V Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2003.
2. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-9.
3. Bayley, A.J.; Light, N.D. **Connective tissue in meat and meat products**. England: Elsevier Science Publishers; 1989. 355p.
4. Berg, H.; Kolar, K. Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the infratec food and feed analyzer. **Fleischw.**, 71:787-9, 1991.
5. Della Torre, J.C.M. et al. Avaliação das metodologias de análise de produto cárneo através de programa interlaboratorial. In: 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2001. **Anais...**São Pedro: CTC-ITAL, 2001. p.466-7.
6. Della Torre, J.C.M. et al. **Capítulo XIII - Carnes e produtos cárneos – 0283/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina**. In: Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - Instituto Adolfo Lutz. **4.ed., 2004 (no prelo)**.
7. Etherington, D.J.; Sims, T.J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.**, 32:539-46, 1981.
8. Fapas Secretariat. Protocol for the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS). Organisation and Analysis of data. **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food Science Laboratory, United Kingdom**. 3ª ed, may 1993.
9. Flint, F.O.; Firth, B.M. Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. **Analyst**, 108:757-9, 1983.
10. Flint, F.O.; Pickering, K. Demonstration of collagen in meat products by an improved micro-sirius red polarization method. **Analyst**, 109:1505-6, 1984.
11. França, J.M.; Waszczynskyj, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **B. CEPPA**, 20:19-28, 2002.
12. Gruber, H.A. et al. Determination of connective-tissue components in beef using simultaneous equations based on amino-acid analyses. **J. Food Science**, 55:1506-9, 1990.

13. Hildebrandt, G.; Hirst, L. Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. **J. Food Science**, 50:568-72, 1985.
14. INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01 - março 2003. 35p.
15. Johnson, S.K. The determination of hydroxyproline in meat using gas chromatography-mass spectrometry. **Meat Science**, 22:221-7, 1988.
16. Jonas, D.A.; Wood, R. Determination of hydroxyproline in meat products: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, 21:113-21, 1983.
17. Josefowicz, M.L.; O'Neill, I.K.; Prosser, H.J. Determination of L-hydroxyproline in meat protein by quantitative Carbon-13 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Anal. Chem.**, 49:1140-3, 1977.
18. Kolar, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73:54-7, 1990.
19. Leite, F. **Validação em análise química**. 1. ed. Campinas: Editora Átomo, 1996. 120p.
20. Murray, A.C.; Jeremiah, L.E. Toluene as an alternative to benzene in the Woessner determination of hydroxyproline. **J. Agric. Food Chem.**, 31:1368-9, 1983.
21. Nguyen, Q.; Zarkadas, C.G. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. **J. Agric. Food Chem.**, 37:1279-86, 1989.
22. Reis, R.A.A et al. Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte – MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 51:589-94, 1999.
23. Sims, T.J.; Bailey, A.J. Connective tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science – 2**. London: Applied Science Publishers Ltd, 1981. p.29-59.
24. Smith, S.H.; Judge, M.D. An HPLC method using FMOC-ADAM for determination of hydroxyproline in muscle. **Meat Science**, 30:351-7, 1991.
25. Steinhart, H.; Bosselmann, A.; Möller, C. Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. **J. Agric. Food Chem.** 42:1943-7, 1994.
26. Swasdee, R.L. et al. Ultrastructural changes during chopping and cooking of a frankfurter batter. **J. Food Science**, 47:1011-3, 1982.
27. Valente Soares, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60:79-84, 2001.
28. Zarkadas, C.G. et al. Amino acid composition and protein contents of selected very low energy reducing diets. **J. Agric. Food Chem.**, 40:2198-207, 1992.
29. Zarkadas, C.G. et al. Assessment of the protein quality of beefstock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products. **Agric. Food Chem.**, 43:77-83, 1995.