

Mônia Stremel Azevedo

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO
DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM CACHAÇAS
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa

Florianópolis, SC
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Azevedo, Mônia Stremel

Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em cachaças utilizando eletroforese capilar de zona [dissertação] / Mônia Stremel Azevedo ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa - Florianópolis, SC, 2012.
106 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica. 3. Determinação de ácidos orgânicos alifáticos. 4. Cachaças. 5. Eletroforese capilar de zona. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Mônia Stremel Azevedo

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO
DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM CACHAÇAS
UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 14 de setembro de 2012.

Prof^ª Dr^ª Roseane Fett
Coordenadora do Curso

Banca examinadora:

Prof^ª Dr^ª Ana Carolina de Oliveira Costa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª Dr^ª Edna Regina Amante
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^º Dr. Gustavo Amadeu Micke
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^º Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Iara, pela presença sempre marcante com amor, carinho, cuidados e educação, além de seguirem ensinando a não desistir nunca!

Ao meu esposo Cristiano, pelo amor, companheirismo e amizade incondicionais em todos os momentos e, por me mostrar que sonhos não determinam o lugar onde podemos chegar, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar onde estamos!

Aos Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto e Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke pela oportunidade e confiança para meu retorno às atividades acadêmicas.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa, pelos conhecimentos e experiência transmitidos, confiança, amizade, dedicação e motivação! Você é inspiração!

Ao Prof^o Dr. Gustavo Amadeu Micke e aos colegas do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) pela oportunidade do trabalho em equipe, amizade e conhecimentos transmitidos!

À Prof^a Dr^a Roseane Fett pela confiança, apoio e oportunidade de ingresso na equipe do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA)!

À equipe do LabQA por tornar o dia a dia de trabalho simplesmente especial!

À amiga e companheira Andressa pelos importantes momentos compartilhados desde a seleção do mestrado: experiências que certamente que nos fizeram pessoas mais fortes e melhores: mais amigas!

Ao Prof^o Dr. Luciano Vitali pela amizade, parceria e contribuições!

À colega de equipe Gabriela Pirassol pelo apoio e companheirismo em um momento crucial!

“Grandes batalhas somente são dadas a grandes guerreiros.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

AZEVEDO, MÔNIA STREMEL. Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em cachaças utilizando eletroforese capilar de zona, 2012. 110 pg. Dissertação de mestrado – Departamento de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

O presente estudo propõe o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular (ACAIBPM) indicadores de qualidade e de processamento em amostras de cachaças produzidas e comercializadas no estado de Santa Catarina. O desenvolvimento do método por eletroforese capilar de zona foi realizado com o auxílio do *software* PeakMaster[®] que avalia o comportamento dos analitos quanto aos parâmetros de mobilidade efetiva e dispersão por eletromigração; e SIMULSC, que constrói curvas de mobilidade dos compostos em função do pH. As condições experimentais foram: eletrólito de corrida, β -alanina 21 mmol L⁻¹ e ácido 3,5 dinitrobenzóico 10 mmol L⁻¹, pH 3,6, injeção hidrodinâmica, 50 mbar/3 s, tensão de 30 kV, polaridade negativa, capilar 73,5 cm (L_{tot}), 64,5 cm (L_{det}), 75 μ m (DI), revestido com quitosana quaternizada, modo de detecção indireto em 254 nm. Os ACAIBPM: maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, succínico e acético foram separados em menos dez minutos, com padrão interno ácido aspártico. A validação intralaboratorial foi realizada para verificação dos parâmetros: linearidade e faixa de trabalho, efeito de matriz, seletividade, repetibilidade, reprodutibilidade parcial, recuperação, limites de detecção e quantificação e robustez. O método se mostrou linear por avaliação visual e R² na faixa de 6,97 a 27,8, 6,24 a 24,9; 9,01 a 36,0; 2,76 a 11,04; 11,5 a 46,1; 8,05 a 32,1; 4,57 a 18,2; 8,11 a 32,4; 7,09 a 28,3; 36 a 144 mg L⁻¹ para os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, succínico e acético, respectivamente,. Os limites de detecção variaram de 0,69 a 5,76 mg L⁻¹ com DPR de 4,9 a 9,4%; os limites de quantificação variaram de 2,76 a 11,5 mg L⁻¹ com DPR de 3,8 a 8,6%; o método mostrou-se robusto para os parâmetros tensão, temperatura, pressão, comprimento de onda, tempo de lavagem e tempo de injeção; a recuperação foi avaliada em sete níveis para estes ácidos, e estes apresentaram valores de recuperação de 89,6 % a 145%. Os valores de

DPR para reprodutibilidade parcial e repetibilidade foram satisfatórios, menores que 9,81 e 12,9%, respectivamente. A metodologia foi aplicada na análise de duas amostras de cachaça não envelhecidas e dez envelhecidas; com preparo de amostra por simples diluição. As concentrações encontradas variaram de 0,19 a 2,99 mg L⁻¹ para o ácido fórmico; 1,02 a 16,5 mg L⁻¹ para o ácido láctico; e 5,39 a 106,4 mg L⁻¹ para ácido acético. A acidez titulável total foi avaliada pelo método titulométrico e as concentrações encontradas apresentaram diferença significativa para $\alpha = 0,05$, demonstrando a potencialidade da técnica para discriminação individual destes ácidos presentes em amostras de cachaça e sua importância no controle de qualidade da bebida, uma vez que estes ácidos podem fornecer informações sobre controles de processo e higiene que venham a afetar a qualidade e rendimento do álcool produzido.

Palavras-chave: ácidos alifáticos; cachaça; envelhecimento; eletroforese capilar.

ABSTRACT

This study proposes the development of a methodology to determine the aliphatic carboxylic acids of low molecular weight (ACAIBPM) indicators of quality and processing in sugarcane spirit samples produced and marketed in Santa Catarina. The method was developed using capillary zone electrophoresis with the aid of Peakmaster®, software that assesses the behavior of analytes for the parameters of effective mobility and electromigration dispersion, and SIMULSC, which builds the compound's mobility curves as a function of pH. The experimental conditions were: background electrolyte; 21 mmol L⁻¹ β-alanine and 10 mmol L⁻¹ 3,5-dinitrobenzoic acid; pH 3,6, hydrodynamic injection; 50 mbar/3 s; 30 kV voltage; negative polarity; capillary 73.5 cm (L_{tot}), 64,5 cm (L_{det}), 75 μm (ID) and coated with chitosan quaternized, indirect detection mode at 254 nm. The ACAIBPM (maleic, malonic, tartaric, formic, citric, malic, glycolic, lactic, succinic and acetic acids) were separated in less than ten minutes using the aspartic acid internal standard. An in-house validation was performed to check the parameters: linearity and working range, matrix effect, selectivity, repeatability, partial reproducibility, recovery, limits of detection and quantification and robustness. The method showed linearity by visual evaluation and R^2 in the range of 6,97 a 27,8, 6,24 a 24,9; 9,01 a 36,0; 2,76 a 11,04; 11,5 a 46,1; 8,05 a 32,1; 4,57 a 18,2; 8,11 a 32,4; 7,09 a 28,3; 36 a 144 mg L⁻¹ for maleic, malonic, tartaric, formic, citric, malic, glycolic, lactic, succinic and acetic acids, respectively. The detection limits were from 0.69 to 5.76 mg L⁻¹ with RSD from 4.9 to 9.4 percent, the quantification limits were from 2.76 to 11.5 mg L⁻¹ with RSD 3.8 to 8.6 percent, the method was robust for voltage, temperature, pressure, wavelength, washing time and injection time parameters; recovery was evaluated in seven levels for these acids that showed values from 89.6 to 145 percent. The values of RSD for partial reproducibility and repeatability were satisfactory, less than 9.81 and 12.9 percent, respectively. The methodology was applied in the analyses of two sugarcane spirit samples not aged and ten aged sugarcane spirit samples, with sample preparation by simple dilution. The concentrations found were from 0.19 to 2.99 mg L⁻¹ for formic acid, from 1.02 to 16.5 mg L⁻¹ for lactic acid and from 5.39 to 106.4 mg L⁻¹ for acetic acid. The total titratable acidity was measured with the titrimetric method, and the concentrations found showed significant differences for $\alpha = 0.05$. This shows the potential of this technique for individual discrimination of

these acids in sugarcane spirit samples and its importance in controlling beverage quality, since these acids can provide information about process controls and hygiene that may affect the quality and yield of alcohol produced.

Keywords: aliphatic acids; sugarcane spirit; aging; capillary electrophoresis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPM	ácidos de baixo peso molecular
ABRABE	Associação Brasileira de Bebidas
ACAIBPM	ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular
Ace	ácido acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATT	acidez titulável total
CE	eletroforese capilar
Cit	ácido cítrico
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CTGA	cloreto de trimetil glicidil amônio
CZE	eletroforese capilar de zona
DAD	detector de arranjos de diodos
DI	diâmetro interno
DPR	desvio padrão relativo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMD	dispersão por eletromigração
EOF	fluxo eletrosmótico
<i>F</i>	razão entre variâncias
FID	detector de ionização de chama
For	ácido fórmico
GC	cromatografia gasosa
Gli	ácido glicólico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IBRAC	Instituto Brasileiro de Cachaça
IEA	Instituto de Economia Agrícola
IN	instrução normativa
LABV/LANAGRO-RS	Laboratório Nacional Agropecuário do estado do Rio Grande do Sul de Análises Físico-Químicas de Bebidas e Vinagres
Lat	ácido láctico
LC-LC	cromatografia líquida bidimensional
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
Mal	ácido málico
Male	ácido maleico

Lista de abreviaturas e siglas (Continuação)

Malo	ácido malônico
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MMQO	método dos mínimos quadrados ordinários
MS	espectrometria de massas
n	número de medidas
p	nível de significância
PI	padrão interno
QTS	quitosana
R	coeficiente de correlação de <i>Ryan-Joiner</i>
R^2	coeficiente de determinação
RMN	ressonância magnética nuclear
SAQQ	sal de amônio quaternário de quitosana
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
Suc	ácido succínico
Tar	ácido tartárico
UV/Vis	ultra-violeta/visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1 JUSTIFICATIVA	17
2.1 CACHAÇA	19
2.1.1 Processo de fabricação.....	20
2.1.2 Legislação e padrões de identidade e qualidade da cachaça	21
2.1.3 Envelhecimento	22
2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS EM BEBIDAS	23
2.3 ELETROFORESE CAPILAR.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	36
OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CAPILAR PREENCHIDO COM QUITOSANA QUATERNIZADA	36
1.1 FERRAMENTAS DE SIMULAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM ELETROFORESE CAPILAR.....	37
1.2 ÂNIONS DE BAIXO PESO MOLECULAR	39
1.3 FLUXO ELETROSMÓTICO E MECANISMOS DE SEPARAÇÃO... ..	41
2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	45
2.2 CAPILAR REVESTIDO COM QTS QUATERNIZADA	45
2.3 INSTRUMENTAÇÃO	46
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3	58
VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CAPILAR PREENCHIDO COM QUITOSANA QUATERNIZADA	58
1.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	59
1.2 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL	61
1.2.1 Linearidade	62
1.2.2 Faixa de trabalho e faixa linear:.....	63
1.2.3 Efeito de Matriz	63
1.2.4 Sensibilidade.....	64
1.2.5 Seletividade/Especificidade	64
1.2.6 Exatidão.....	64
1.2.7 Precisão.....	65

1.2.8 Limite de detecção (LD).....	66
1.2.9 Limite de quantificação (LQ)	66
1.2.10 Robustez	67
1.2.11 Padronização interna	67
1.2.12 <i>System suitability</i>	67
2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	69
2.2 COLUNAS CAPILARES	69
2.3 OUTROS MATERIAIS	69
2.4 REAGENTES E SOLUÇÕES	69
2.5 METODOLOGIAS	70
2.5.1 Condição experimental para determinação de ACAIBPM por CE ..	70
2.5.2 Determinação de Acidez Titulável Total (ATT).....	71
2.5.3 <i>System Suitability</i>	71
2.5.4 Linearidade	71
2.5.5 Efeitos de matriz.....	72
2.5.6 Seletividade	72
2.5.7 Limites de detecção e quantificação	72
2.5.8 Repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação.....	73
2.5.9 Robustez	73
2.5.10 Preparo de amostras.....	73
3.1 <i>SYSTEM SUITABILITY</i>	75
3.2 LINEARIDADE	75
3.3 EFEITO DE MATRIZ	81
3.4 SELETIVIDADE	85
3.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO, REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL	86
3.6 ROBUSTEZ.....	89
3.7 QUANTIFICAÇÃO EM AMOSTRAS	97
REFERÊNCIAS	103
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	105

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), o potencial de exportação da cachaça ainda é pouco explorado, apesar desta bebida tão popular já apresentar um mercado consolidado no Brasil. Este cenário, apesar de desatualizado por falta de informações, é confirmado pelo aumento tímido da receita de exportação gerada por este produto no período de uma década, que em 1996 foi de 9,5 milhões de dólares, enquanto que em 2005 foi de apenas 12,3 milhões de dólares, representando apenas um incremento de 29% (IEA, 2011). Dados do Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC), revelam que Pernambuco é o segundo maior produtor e exportador de cachaça do País (seguido de São Paulo) produzindo em média 100 milhões de litros por ano. Os maiores produtores de cachaça são os estados de São Paulo (45%), Pernambuco (12%), Ceará (11%), Rio de Janeiro (8%), Minas Gerais (8%), Goiás (8%), Paraná (4%), Paraíba (2%) e Bahia (2%), sendo os três primeiros responsáveis por quase toda produção de cachaça industrial (EMBRAPA, 2011). No País, as microempresas correspondem a 99% do total de produtores e são responsáveis pela geração de mais de 600 mil empregos diretos e indiretos, possuindo capacidade instalada de produção de aproximadamente 1,2 bilhões de litros ao ano, porém, menos de 1% dessa produção é exportada. Hoje a cachaça é responsável por 7% do mercado de bebidas no Brasil (uísque, licor, vodca, vinho e tequila representam 3% e cerveja cerca de 90%), sendo que apenas 1% do total é exportado, principalmente para a Europa, onde o preço da bebida alcança valores bem mais elevados (ABRABE, 2009).

Apesar da tradição e importância econômica, a cadeia produtiva da cachaça e aguardente no país não é tecnologicamente homogênea. O aprimoramento da qualidade desta bebida tão popular é essencial para que atenda aos padrões internacionais e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação. Além disso, proporcionaria aceitação no mercado interno pelas classes de maior poder aquisitivo, as quais exigem bebidas de boa qualidade (MIRANDA et al., 2007).

O envelhecimento é uma etapa importante da produção da cachaça e aguardente, porém, não obrigatória. A madeira é uma matriz ideal para o envelhecimento destes destilados, pois permite uma

disponibilidade lenta de oxigênio, ocorrendo reações químicas e incorporando diversas substâncias, como os fenóis, ésteres, óleos voláteis, açúcares, substâncias tânicas, pigmentos e compostos inorgânicos que influenciam na cor, odor, sabor e adstringência, formando assim, um “buquê” especial. A madeira tradicionalmente empregada na fabricação de barris para o envelhecimento de cachaças e aguardentes é o carvalho, por ser utilizado mundialmente no envelhecimento de outras bebidas, como uísque, conhaque, vinho, etc. Porém, já estão sendo estudadas influências de madeiras nacionais no processo de envelhecimento, como umburana, jequitibá, jatobá, bálsamo, amendoim, castanheira, louro canela, dentre outras.

A diversidade de indústrias de cachaças existentes no Estado de Santa Catarina faz com que haja uma intensa variabilidade dos compostos característicos encontrados em cachaças envelhecidas, incluindo-se outros relacionados à identidade. O monitoramento de cachaças envelhecidas torna-se imprescindível, pois estas acumulam significativa coletânea de informações sobre os processos de armazenamento. Sua caracterização, considerando estas informações e seus impactos, representa um importante avanço, e denotará a evolução do conhecimento sobre esta bebida tipicamente brasileira.

Essa importância no contexto econômico, as exigências advindas do mercado da cachaça, inclusive com a exportação aos países da Europa, Japão e Estados Unidos, juntamente com a crescente preocupação em proteger o consumidor, demandam uma melhor qualidade do produto fabricado e seu permanente controle. Este estudo justifica-se fundamentalmente pela carência de dados disponíveis na literatura acerca da composição e avaliação de características de identidade de cachaças envelhecidas ou não. O desenvolvimento de métodos analíticos alternativos utilizando eletroforese capilar aplicados a determinação combina características desejáveis de técnicas analíticas e a facilidade no preparo das amostras.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia validada intralaboratorialmente para determinação de ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular em amostras de cachaça (envelhecidas e não envelhecidas) utilizando eletroforese capilar como ferramenta analítica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CACHAÇA

Apesar da trajetória de quinhentos anos de subalternidade, lutando contra o preconceito, a cachaça, bebida tipicamente brasileira é hoje o destilado de cana mais consumido no Brasil (EMBRAPA, 2011). Esta bebida é obtida do caldo de cana fermentado e recebe várias denominações, tais como caninha, pinga, dengosa, moça branca, água de cana entre outras, variando de acordo com a região (CARDOSO et al., 2008). Conforme Decreto nº 6871 de 04 de junho de 2009, que regulamenta a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas e Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 (IN nº 13/2005) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA): cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressos em sacarose (BRASIL, 2009).

Muitas são as versões com relação ao surgimento da cachaça, sendo uma destas, a descoberta pelos escravos dos engenhos de açúcar em meados do século XVI, no período colonial. Essa bebida foi por muito tempo pejorativamente tratada como bebida de escravos, devido principalmente à sua origem e por ser largamente consumida por essa população. No período colonial, o tráfico de escravos impôs a valorização contínua da bebida, pois era moeda sem embargo no comércio de negros africanos (FEITOSA, 2005).

Mesmo após várias tentativas por parte da Corte Portuguesa em tentar diminuir o consumo da cachaça, esta se tornou a bebida alcoólica mais consumida no Brasil Colônia. Ao começar a ganhar força entre todas as classes sociais, setores da elite e da classe média do século XIX e início do século XX, iniciou-se um movimento preconceituoso contra a cachaça, uma vez que essas classes buscavam uma identidade próxima à bebida europeia. Somente durante a Semana de Arte de 1922 é que a cachaça voltou a ser considerada um símbolo da cultura nacional e, desde então é considerada a mais famosa e brasileira das bebidas em todo o mundo (SERAFIM, 2010; EMBRAPA, 2011).

2.1.1 Processo de fabricação

A cachaça é obtida da destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado empregando-se basicamente dois sistemas: alambiques (cobre ou aço inoxidável) ou colunas de aço inoxidável. Quando a destilação é realizada em alambiques, são obtidas três frações, com base em seu conteúdo alcoólico: a fração “coração”, que abrange um grau alcoólico de 38 a 50° GL, representa aproximadamente 80 a 85 % do volume total do destilado e é considerada a fração de melhor qualidade; a fração “cabeça”, que compreende um grau alcoólico de 50 a 70° GL, obtido na fase inicial do processo de destilação, é mais rica em substâncias voláteis do que em etanol; e a fração “cauda” (ou água fraca), que possui grau alcoólico entre 10 e 38° GL, é obtido no final do processo de destilação e apresenta produtos indesejáveis, tais como furfural, ácido acético, álcoois superiores, dentre outros. Os produtos dos destilados “cabeça” e “cauda”, além de comprometer o sabor da cachaça poderão vir a prejudicar a saúde do consumidor quando incorporados à bebida (SEBRAE, 2008; RECHE; FRANCO, 2009). Quando são empregadas colunas de aço inoxidável industriais, no entanto, um processo de destilação contínua produz uma fração única, compreendendo um grau alcoólico entre 38 e 48° GL, sendo adicionado posteriormente a esta fração água e açúcar para então gerar o produto final, chamada de cachaça de coluna ou industrial (SOUZA et al., 2009). Outro fator importante na destilação em coluna é em relação à quantidade de pratos teóricos que esta possui, pois enquanto que em um alambique simples há apenas um prato, nas colunas de baixo grau utilizadas na produção de cachaça este número varia de 15 a 20 pratos. O número de pratos, a composição do material da coluna e do alambique e, o fato de nos alambiques ocorrerem separações das frações, explicam em grande parte as diferenças na composição química de cachaças oriundas de coluna e alambique (RECHE; FRANCO, 2009).

O processo produtivo da cachaça se resume às seguintes etapas: moagem, filtração, fermentação, destilação, envelhecimento, envase e rotulagem (SEBRAE, 2008).

2.1.2 Legislação e padrões de identidade e qualidade da cachaça

A aguardente e a cachaça estão submetidas à Legislação Nacional sob IN nº 13/2005, de responsabilidade do MAPA (BRASIL, 2005), que estabelece os padrões de identidade e de qualidade que as bebidas devem atender (Tabela 1).

Tabela 1- Características físicas e químicas para a aguardente de cana de açúcar e cachaça, estabelecidas pela legislação brasileira.

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Acidez volátil em ácido cético	mg 100 mL ⁻¹	-	150
Ésteres, em acetato de etila	álcool anidro	-	200
	mg 100 mL ⁻¹		
Aldeídos, em aldeído acético	álcool anidro	-	30
	mg 100 mL ⁻¹		
Furfural + hidroximetilfurfural	álcool anidro	-	5
	mg 100 mL ⁻¹		
Álcoois superiores*	álcool anidro	-	360
	mg 100 mL ⁻¹		
Congêneres**	álcool anidro	200	650
	mg 100 mL ⁻¹		
Álcool metílico	álcool anidro	-	20
	mg 100 mL ⁻¹		
Cobre	álcool anidro	-	5
	mg L ⁻¹		
Extrato seco	g L ⁻¹	-	6***

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílicos + n-propílico; **Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural/hidroximetilfurfural + álcoois superiores; e ***Aguardente de cana ou cachaça “adoçada”: máximo 30 g L⁻¹.

Fonte: BRASIL (2005).

De acordo com Brasil (2005), a concentração máxima de álcoois superiores atualmente permitida é de 360 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, e não mais 300 mg 100 mL⁻¹ estabelecidos pela legislação anterior (BRASIL, 1974), favorecendo a conformidade de aguardentes anteriormente consideradas fora dos padrões legais do MAPA.

Além disso, foram definidas quantidades máximas permitidas de alguns contaminantes anteriormente não mencionados como, por exemplo, carbamato de etila (150 µg L⁻¹), acroleína (5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), álcool sec-butílico (10 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro),

álcool n-butílico (3 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), chumbo (200 µg L⁻¹) e arsênio (100 µg L⁻¹).

2.1.3 Envelhecimento

De acordo com a IN nº 13/2005, a cachaça envelhecida refere-se à bebida definida no item 2.1.2 da IN, que contiver, no mínimo, 50% de cachaça ou aguardente de cana envelhecidas em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a um ano. Ainda são denominadas (BRASIL, 2005):

Aguardente de Cana Premium: bebida definida no item 2.1.1 da IN, que contém 100% de aguardente de cana ou destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar envelhecidos em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a 1 ano;

Cachaça Premim: bebida definida no item 2.1.2 da IN, que contém 100% de cachaça ou aguardente de cana envelhecidas em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a 1 ano;

Aguardente de Cana Extra Premium: bebida definida no item 2.2.2 da IN envelhecida por um período não inferior a 3 anos;

Cachaça Extra Premium: bebida definida no item 2.2.9 da IN envelhecida por um período não inferior a 3 anos.

Os barris de madeira servem como recipientes de armazenamento durante o período de envelhecimento, fornecendo propriedades sensoriais ao produto por meio da extração dos compostos da madeira (SÁDECKÁ et al., 2008).

Durante o processo de envelhecimento em barris, a bebida sofre variadas mudanças físico-químicas por meio de compostos liberados da madeira, outras substâncias do destilado, além de reações envolvendo compostos tanto do destilado quanto da madeira (CANAS et al., 2003), responsáveis por importantes propriedades sensoriais que dependerão da espécie botânica e tratamento da madeira utilizada.

A madeira é constituída por polímeros, normalmente celulose, hemicelulose, lignina e taninos, que desempenham um importante papel no envelhecimento das bebidas destiladas. A hidrólise alcoólica ácida da lignina produz aldeídos aromáticos e a hidrólise ácida de taninos e hemiceluloses produz ácidos fenólicos e monossacarídeos, respectivamente. Flavonóis também são detectados em bebidas envelhecidas extraídos diretamente da madeira, e, ao mesmo tempo, a ação de agentes oxidantes (oxigênio e peróxidos) sobre os compostos extraídos da madeira permite a síntese de novos compostos aromáticos como quinonas, aldeídos, metilcetonas, dentre outros (MADRERA et al., 2003). A importância se deve ao já comprovado envolvimento desses compostos em avaliações de autenticidade, como marcadores de envelhecimento e, ainda, na diferenciação de cachaças envelhecidas, conforme fatores primários determinantes da qualidade da bebida. Tais fatores podem estar relacionados à espécie botânica e origem geográfica da madeira utilizada na fabricação do barril, bem como se o mesmo está sendo utilizado pela primeira vez, se sofreu tratamento térmico, condições de envelhecimento (incluindo temperatura e umidade), potencial efeito benéfico para a saúde humana (relacionada à presença de compostos fenólicos), entre outros (CANAS et al., 2003).

2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS EM BEBIDAS

Os ácidos orgânicos têm papel fundamental na manutenção da qualidade e valor nutricional de alimentos. Esses ácidos podem ser adicionados como acidulantes ou estabilizadores em diversas matrizes, ou ainda utilizados como indicadores de esterilização inadequada e/ou contaminação microbiana durante o armazenamento. São produtos oriundos da fermentação de açúcares (com formação de ácidos voláteis), como também podem contribuir para propriedades sensoriais dos alimentos e bebidas (JURADO-SÁNCHEZ et al., 2011).

Os ácidos carboxílicos são caracterizados pela presença do grupo carboxila (-COOH) que, dissociado em água forma cátion hidrônio e ânion carboxilato, justificando a propriedade ácida destes compostos (McMURRY, 2008). São comumente encontrados em amostras de alimentos e bebidas, e, sua vasta diversidade denota a importância da determinação destes compostos em matrizes alimentícias (MATO et al., 2007).

No processo fermentativo, quando os carboidratos são metabolizados pelos micro-organismos, ocorre a produção de ácido

pirúvico como substância intermediária e, conforme condições nutricionais existentes, este pode dar origem a diferentes compostos químicos. De acordo com tipo de produto final formado, os processos de fermentação podem ser classificados em fermentação láctica (bactérias lácticas), alcoólica (leveduras e bactérias do gênero *Zimomonas*), mista ou fórmica (bactérias da família *Enterobacteriaceae*), butanodióica (*Serratia*, *Enterobacter* e *Bacillus*), butírica (bactérias butíricas) e propiônica (bactérias propiônicas: *Propionibacterium*) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A determinação de ácidos orgânicos em bebidas é importante pela influência nas propriedades sensoriais e controle microbiológico. Klampfl (2007) relatou os seguintes ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular (ACAIBPM) em bebidas, a saber: (i) *sucos de raiz de chicória e beterraba*: fórmico, tartárico, málico, cítrico, succínico e láctico; (ii) *vinhos*: oxálico, tartárico, málico, succínico, cítrico, acético e láctico; (iii) *cerveja*: oxálico, fórmico, málico, cítrico, succínico, acético e láctico; (iv) *infusões de chás*: oxálico, cítrico, málico, aspártico e glutâmico; (v) *café*: oxálico, fórmico, succínico, maleico, málico, cítrico, acético e láctico; (vi) *vinho do porto*: tartárico, málico, acético e láctico. MATO et al. (2006) relataram a presença de AOABPM em sucos: (i) *uva*: tartárico, málico e cítrico; (ii) *maçã*: málico; (iii) *abacaxi e laranja*: málico e cítrico; (iv) *limão*: málico, cítrico e succínico; (v) *espinafre*: oxálico, cítrico, málico, succínico e acético.

Nos vinhos, por exemplo, a diferenciação pode ser feita entre ácidos originários da uva (ácidos tartárico, málico e cítrico) e aqueles oriundos do processo de fermentação (ácidos acético, láctico e succínico) (MATO et al., 2007).

Os ácidos orgânicos são importantes constituintes de produtos derivados da garapa¹, devido ao seu efeito nas propriedades sensoriais, estabilidade e aceitabilidade. Estes ácidos são originários do processo de destilação da garapa e/ou da fermentação diretamente e exercem forte influência sobre a qualidade e as propriedades sensoriais das bebidas alcoólicas e na estabilidade do mosto durante a etapa fermentativa. As moléculas dos ácidos penetram nas células dos micro-organismos por difusão simples, interferindo no metabolismo, alterando a reposição e a

¹ Líquido extraído da cana de açúcar no processo de moagem.

absorção de nutrientes e o crescimento celular, promovendo o controle biológico. A presença de seus respectivos ésteres confere à bebida características sensoriais diferenciadas, agregando aromas e sabores frutados e achocolatados (SERAFIM et al., 2011).

A presença de ácidos orgânicos no destilado está, ainda, relacionada aos cuidados dispensados durante a produção da bebida, como por exemplo, os ácidos acético e lático que podem estar associados à contaminação do mosto por micro-organismos. Esses compostos estão associados principalmente à contaminação do mosto por micro-organismos do gênero *Acetobacter* e *Lactobacillus*, respectivamente (SCHWAN et al., 2001), sendo que uma contaminação pode permitir que parte do substrato venha a tornar-se passível de fermentações secundárias. Portanto, ambos podem ser indicadores de higiene e condições de armazenamento (temperatura) utilizados pelos produtores no decorrer do processo fermentativo (SÁDECKÁ et al., 2008; SERAFIM et al., 2011).

As concentrações e natureza dos ácidos orgânicos presentes em bebidas destiladas podem fornecer informações sobre sua origem, técnicas de processamento e envelhecimento a que são submetidas. O perfil destes compostos polares pode ser utilizado para diferenciação, classificação, identificação de origem ou possível adulteração de bebidas (SÁDECKÁ et al., 2008).

Alguns pesquisadores descreveram a cerca da presença de ACAIBPM em aguardentes: fórmico, acético e tartárico (CHEN et al., 2003), oxálico, maleico, fosfórico, malônico, tartárico, fórmico, málico, glicólico, lático, glucônico e succínico (SÁDECKÁ et al., 2008), fórmico, fumárico, succínico, oxálico, málico, tartárico, acético, lático e cítrico (MORENO et al., 2003), succínico, glicólico, lático e acético (MORENO et al., 2003), lático, glicólico, oxálico, malônico, succínico, málico, tartárico (PARK et al., 1999); e em cachaças: acético, lático, glicólico, succínico (SERAFIM et al., 2011) utilizando diversas técnicas analíticas.

Tendo em vista que os ACAIBPM têm grande influência nas propriedades sensoriais e podem fornecer informações sobre controles de processo e higiene que venham a afetar a qualidade e rendimento do álcool produzido e a carência de estudos na literatura acerca da caracterização destes em amostras de cachaças, faz-se interessante e necessário o monitoramento destes compostos,

2.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, ou ainda, migração diferenciada de compostos neutros que possam interagir com substâncias que apresentem velocidade de migração diferente da velocidade de migração² do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997; SILVA, 2007).

Como técnica analítica já muito bem estabelecida em todo o mundo (PIÑERO; BAUZA; ARCE, 2011), a CE apresenta inúmeras vantagens além da simplicidade instrumental, alta performance e versatilidade analítica: baixo custo (volume reduzido de solventes e mínima geração de resíduos), volume de injeção da amostra na ordem de nanolitros e compatibilidade com uma variedade de sistemas de detecção (TAVARES, 1996; SILVA, 2007, MICKE, 2009; PIÑERO; BAUZA; ARCE, 2011).

A CE está presente em um grande número aplicações, das mais diversas áreas além da química: genética, farmacêutica, clínica, alimentos, ambiental, controle de qualidade, forense e bioquímica; e com sua inserção mais restrita em áreas como veterinária, toxicológica, agricultura, botânica, neurociência e petroquímica (PIÑERO; BAUZA; ARCE 2011).

A CE agrupa um grande número de separações eletrodirigidas utilizando diferentes mecanismos de separação. A escala de aplicações desta técnica varia desde a análise de moléculas pequenas até moléculas de milhares de Daltons. Os modos podem ser agrupados em subclasses (TAVARES, 1997; TAGLIARO *et al.*, 1998): eletroforese capilar de zona; eletroforese capilar de afinidade; eletroforese capilar de peneiramento; eletroforese capilar em gel; focalização isoeletrica capilar; isotacoforese capilar; cromatografia electrocinética;

² É o movimento de um líquido através de uma membrana (ou capilar) como consequência da aplicação de um campo elétrico.

cromatografia eletrocinética micelar; cromatografia eletrocinética em microemulsão; e eletrocromatografia capilar.

Neste trabalho será utilizado o modo de eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*), um dos modos de separação eletroforéticos mais utilizados em função de facilidade de implementação e otimização de condições experimentais. A técnica é baseada na diferença entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos) em eletrólitos aquosos ou não aquosos que podem conter aditivos de forma a interagir com o analito e alterar as mobilidades eletroforéticas³ (SILVA, 2007). O capilar é preenchido com eletrólito, geralmente com característica tamponante e a separação ocorre por meio de estratégias como maximização das diferenças entre mobilidades efetivas de solutos e minimização das causas de alargamento de zonas (TAVARES, 1997).

Os métodos mais difundidos em CE utilizam detectores na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e fluorescência, pois a maioria dos compostos estudados apresenta absorção na região de 200 a 900 nm ou podem ser derivatizados para tal.

A detecção por absorção direta é restrita a compostos que possam absorver na faixa de comprimento de onda disponível (200-900 nm). Quando os compostos não apresentam absorção na região UV-Vis, o modo de detecção mais explorado na literatura é a detecção indireta (JAGER; TAVARES, 2001) efetuada (indiretamente) pela diminuição transiente do sinal do eletrólito devido ao deslocamento do co-íon cromóforo pelo analito (ânion ou cátion) durante a passagem deste pelo detector (JAGER; TAVARES, 2001).

É possível observar em trabalhos publicados na literatura nos últimos cinco anos, que os métodos utilizando eletroforese capilar aplicada à análise de ACAIBPM em bebidas empregam em sua maioria eletroforese capilar de zona, com apenas um trabalho que utiliza isotacoforese; os limites de detecção são variados e alcançam níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$; e os tempos de análise ultrapassam 10 minutos, exceto para o estudo publicado por Mato et al., (2006) que atinge 3,5 minutos para a análise de diversos ACAIBPM em vinhos e sucos; demonstrando a

³ É a taxa de migração observada (em eletroforese), n , ou a velocidade eletroforética, n_{ep} , dividida pela magnitude do campo elétrico aplicado, E , em um dado meio.

aplicabilidade da técnica na determinação dessas substâncias como importantes indicadores de qualidade dessas matrizes. Cabe salientar a facilidade e o reduzido tempo de preparo das amostras, o que demonstra a possibilidade de alta frequência analítica proporcionada pela CE, requisito fundamental no desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é desenvolver e validar uma metodologia para determinação de ACAIBPM, utilizando eletroforese capilar, com detecção no modo indireto. O método otimizado com o auxílio de ferramentas de simulação será aplicado em amostras de cachaça (envelhecidas e não envelhecidas) comercializadas no estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinação de ACAIBPM (acético; aspártico; fórmico; maleico; malônico; cítrico; glicólico; láctico; succínico) utilizando ferramentas de simulação — *software* PeakMaster[®], que avalia o comportamento dos analitos quanto aos parâmetros de: mobilidade efetiva e dispersão por eletromigração (EMD) e SIMULSC que constrói curvas de mobilidade em função do pH presentes em amostras de cachaça utilizando CE;
- Modificar um capilar de sílica fundida usando quitosana quaternizada por simples lavagem do capilar com a solução do polímero para formação do revestimento e inversão do EOF;
- Selecionar um padrão interno adequado para o método;
- Avaliar o preparo das amostras por simples diluição;
- Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros de: linearidade, faixa de trabalho, efeito de matriz, precisão, exatidão seletividade, limites de detecção e quantificação e robustez.
- Avaliar os parâmetros de validação com o auxílio de ferramentas e testes estatísticos;
- Aplicar o método desenvolvido e devidamente validado na análise dos ácidos fórmico, láctico e acético em amostras de cachaça produzidas e comercializadas no estado de Santa Catarina;
- Comparar os resultados do método desenvolvido por CE com o método oficial para determinação de acidez fixa nas amostras estudadas.

REFERÊNCIAS

ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas) -. Disponível em <<http://www.abrabe.org.br>> Acessado em 28/08/2011.

Brasil Escola. Disponível em <<http://www.brasilecola.com>> Acessado em 21/08/2011.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 371 de 18 de setembro de 1974. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 de setembro de 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. n. 15, de 29 de junho de 2005. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça.**

CANAS, S.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I.; SOUSA, R. B. High-performance liquid Chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 496–502, 2003.

CARDOSO, M. G.; NAVICKIENE, S.; EMÍDIO, S. E.; SILVA, T. C. S.; SILVA, M. M. S. Análise de poluentes orgânicos tóxicos na cachaça. **Revista Fapese**, v. 4, n. 2, p. 5-18, jul./dez. 2008.

CHEN, W.; LIN, C.; CHEN, T.; MISRA, T. K.; LIU, C. Capillary electrochromatographic analysis of aliphatic mono- and polycarboxylic acids. **Electrophoresis**, v. 24, p. 970–977, 2003.

EMBRAPA: Agência de Informação. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acessado em 21/08/2011.

FEITOSA, P. C. L. **A cachaça como identidade cultural.** Especialização em Turismo, Cultura e Laser. Universidade de Brasília, Brasília - DF.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.

IBRAC. Instituto Brasileiro de Estudos de Concorrência, Consumo e Comércio -. Disponível em <<http://www.ibrac.org.br>> Acessado em 30/08/2011.

IEA. Instituto de Economia Agrícola Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br>> Acessado em 28/08/2011.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F.M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JURADO-SÁNCHEZ, B.; BALLESTEROS. E.; GALLEGO, M. Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. **Talanta**, v. 84, p. 924–930, 2011.

KLAMPFL, C. W. Determination of organic acids by CE and CEC methods. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3362–3378, 2007.

MADRERA, R. R.; GOMIS, D. B.; SPRANGER, M. I., ALONSO, J. J. M. Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on composition of cider brandy in phenolic and furanic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7969-7973, 2003.

MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J., SANCHO, M. T. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, p. 190–197, 2006.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, J.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Food Chemistry**, v. 102, p. 104–112, 2007.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, p. 1175–1188, 2005.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J.F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6742-6746, 2010.

McMURRY, J. **Organic Chemistry**. 7^a Ed; Thomson Learning Academic Resource Center, USA: 2008.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol - total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

MIRANDA, M. B.; MARTINZ, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 (4), p. 897-901, out.-dez. 2007.

PIÑERO, M.; BAUZA, R.; ARCE, L. Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1379-1393, 2011.

RECHE, R. V.; FRANCO, D. W. Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria. **Química Nova**, v. 32. n. 2, p. 332-336, 2009.

SÁDECKÁ, J., MÁJEK, P., THÓTHOVÁ J. CE Profiling of Organic Acids in Distilled Alcohol Beverages Using Pattern Recognition Analysis. **Chromatography**, v. 67, p. S69-S74, 2008.

SEBRAE. Cachaça Artesanal: Estudos de mercado SEBRAE/ESPM 2008. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Sebrae: 2008.

SERAFIM, F. A. T. **Ácidos orgânicos em Aguardentes de Cana de Açúcar**. Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30 (3), p. 740-744, 2007.

SOUZA, P. P.; OLIVEIRA L. C. A.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L. *, AUGUSTI, R. Brazilian cachaça: “Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1064–1068, 2009.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20 (5), p. 493-511, 1997.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CAPILAR PREENCHIDO COM QUITOSANA QUATERNIZADA

1 INTRODUÇÃO

Na otimização de métodos utilizando eletroforese capilar, são muitas as variáveis a serem consideradas, a saber: distribuição de carga, mobilidade eletroforética e absorvidade molar do soluto; pH, capacidade tamponante e força iônica do eletrólito de corrida; velocidade do fluxo eletrosmótico no pH determinado; viscosidade do meio; possíveis interações do soluto com a parede do capilar; tensão aplicada; corrente gerada durante a aplicação da diferença de potencial; temperatura; diâmetro interno e comprimento do capilar, entre outras (LANDERS, 2008). A modificação desses parâmetros na maioria das vezes influencia de forma positiva ou negativa o desempenho das separações. Para cada método a ser desenvolvido, cada uma dessas variáveis deveria ser sistematicamente analisada a fim de garantir a eficiente separação dos analitos a serem analisados.

1.1 FERRAMENTAS DE SIMULAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM ELETROFORESE CAPILAR

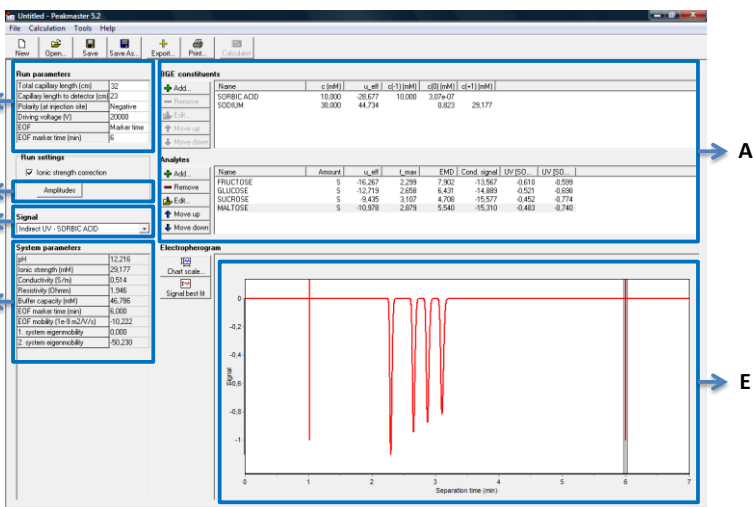
Um ferramenta valiosa que pode ser utilizada como suporte no desenvolvimento de um método em eletroforese capilar de zona é o *software* de simulação PeakMaster[®], desenvolvido por Găz et al.. (2005) (GAŠ et al., 2001; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; GAŠ, 2002; ŠTĚDRÝ et al., 2003; ŠTĚDRÝ et al., 2004; GAŠ et al., 2005)

Este *software* tem se mostrado importante para simulações, pois fornece valores de eletrodispersão por migração dos solutos, permitindo prever os efeitos eletrodispersivos durante o desenvolvimento do método; possibilita a escolha de eletrólitos contendo múltiplos co-íons e contra-íons, pois indica a presença dos chamados picos de sistema, que podem prejudicar uma determinada separação; calcula os valores de razões de transferência para os analitos; sendo, portanto, muito condizente com a realidade, uma vez que os picos simulados são muito parecidos aos obtidos experimentalmente. A versão 5.3 do PeakMaster[®] permite a simulação por detecção indireta, direta ou por condutividade. Outros parâmetros não menos importantes são obtidos a partir da utilização desse aplicativo, tais como pH, força iônica e capacidade tamponante do eletrólito de corrida.

A grande vantagem do uso desta poderosa ferramenta é a obtenção de todas essas informações a respeito do método a ser desenvolvido sem a necessidade de consumo de reagentes e consequente

geração de resíduos. O *software* contém em seu banco de dados moléculas com diversas características, aproximadamente 400 compostos, que podem ser adicionadas ao método simulado, ou como constituinte do eletrólito de corrida, ou como analito. Ainda é possível a inclusão de outras moléculas ao banco de dados, desde que conhecidos os valores de pKa e mobilidade eletroforética da espécie ionizada. A Figura 1 ilustra a janela do aplicativo com um exemplo ilustrativo da simulação da separação dos carboidratos frutose, glicose, sacarose e maltose com detecção indireta.

Figura 1- Janela do *software* PeakMaster[®] com a simulação da separação de quatro carboidratos. (A) constituintes do eletrólito de corrida selecionados; (B) parâmetros instrumentais e tempo ou mobilidade do EOF; (C) aplicativo que permite a simulação da amplitude e formato dos picos; (D) modo de detecção; (E) eletroferograma simulado; (F) outros parâmetros relacionados à separação.



Fonte: *software* PeakMaster[®]

Diversos trabalhos disponíveis na literatura mostram a eficiência desta ferramenta de simulação para o desenvolvimento de métodos rápidos e com baixos custos operacionais (PIOVEZAN et al., 2010; MICKE et al., 2009; COSTA et al., 2007).

Rizelio et al. (2012) desenvolveram um método para determinação de glicose, frutose e sacarose por electroforese capilar. A tendência dos analitos sofrerem efeitos eletrodispersivos e a capacidade tampoadora foram avaliadas usando o *software* PeakMaster® e considerados na otimização do eletrólito de corrida, constituído por ácido sórbico 20 mmol L⁻¹, CTAB 0,2 mmol L⁻¹ e NaOH 40 mmol L⁻¹ (pH 12,2). Na condição ótima simulada a separação das substâncias investigadas foi alcançada em menos de 2 minutos.

Os mesmos autores (RIZELIO et al., 2012) desenvolveram um método rápido para determinação de K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺ em mel. O eletrólito de corrida foi otimizado a partir do *software* PeakMaster®. A composição do eletrólito simulado foi definido com imidazol 30 mmol L⁻¹, ácido acético 300 mmol L⁻¹ e ácido láctico 140 mmol L⁻¹, pH de 3,0, e a separação dos cátions foi alcançada em menos de 2 minutos, usando Ba²⁺ como padrão interno.

1.2 ÂNIONS DE BAIXO PESO MOLECULAR

A análise de ânions encontra extensa aplicação em ciência dos alimentos, incluindo a caracterização de bebidas (MORENO et al., 2003; JURADO-SÁNCHEZ et al., 2011) Na literatura os ânions de baixo peso molecular (ABPM) podem ser analisados simultaneamente por diferentes técnicas de separação. Recentemente esses compostos foram determinados em alimentos e bebidas utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês gas chromatography-mass spectrometry) (GALLAGHER et al., 2010; JURADO-SÁNCHEZ et al., 2011); GC com detector de ionização de chama (GC-FID, do inglês gas chromatography-flame ionization detector) (SERAFIM et al., 2011); cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês high performance liquid chromatography) com detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis) (ZHANG et al., 2011); e cromatografia líquida bidimensional (LC x LC) (BRUDIN et al., 2010). A Tabela 2 apresenta algumas metodologias desenvolvidas por CE para determinação dessas substâncias em bebidas.

Tabela 2 - Metodologias desenvolvidas por CE para determinação de ACAIBPM em bebidas.

MATRIZ	ABPM	CAPILAR	ELETRÓLITO	MODO DE SEPARAÇÃO	TEMPO DE CORRIDA (min)	REF
Vinho tinto	tartárico; málico; succínico; acético; láctico	L _{ext} = 61,2 cm L _{det} = 50 cm Ø = 75 µm	Ácido benzóico 22 mmol L ⁻¹ Tris 1,0 mol L ⁻¹ ; MeOH 35% (v/v), pH 6,1	CZE	3,5	Bianchi et al. (2005)
Vinho do porto	tartárico; málico; láctico; succínico; acético	L _{ext} = 78 cm L _{det} = 67 cm Ø = 75 µm	PDCA 5 mmol L ⁻¹ ; CTAB 0,5 mmol L ⁻¹ ; pH 5	CZE	10	Esteves et al. (2004)
Vinhos tinto e branco; sucos de uva, maçã, laranja e abacaxi	oxálico; fórmico; tartárico; málico; succínico; málico; glutárico; pirovico; acético; láctico; citrico; butírico; benzóico; sórbico; glicônico	L _{ext} = 60 cm L _{det} = 75 µm	Tampão fosfato (NaH ₂ PO ₄ , 7,5 mmol L ⁻¹ e Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mmol L ⁻¹); TTAOH 2,5 mmol L ⁻¹ (inversor do FEO); CaCl ₂ , 0,24 mmol L ⁻¹ ; pH 6,40	CZE	3,5	Mato et al. (2006)
Produtos derivados de uva; mosto; vinho; aguardente e vinagre	fórmico; fórmico; succínico; oxálico; málico; tartárico; acético; láctico; citrico	L _{ext} = 60 cm L _{det} = 53 cm Ø = 75 µm	TBS 10 mmol L ⁻¹ ; TTAOH 0,5 mmol L ⁻¹ com agentes complexantes: Ca ²⁺ e Mg ²⁺ (10 mg L ⁻¹)	CZE	20	Moreno et al. (2003)
Lignina comercial (resina e madeira) tratadas com oxigênio e amostras de vinho tinto de uvas Pinot Noir	sulfúrico; oxálico; fórmico; málico; fumárico; málico; succínico; málico; tartárico; fosfórico; acético; glicólico; citrico; láctico	L _{ext} = 60 cm L _{det} = 30 cm Ø = 50 µm	Ácido dicarboxílico-2,3-pirizina 20 mmol L ⁻¹ ; tricina 65 mmol L ⁻¹ ; BaCl ₂ 2 mmol L ⁻¹ ; CTAB 0,5 mmol L ⁻¹ ; uréia 2 mmol L ⁻¹ ; pH 8	CZE	10	Rovio et al. (2010)
Cachaças e destilados de vinho	oxálico; málico; fórmico; malônico; tartárico; fórmico; citrico; málico; glicólico; láctico; glucônico; aspártico succínico	L _{ext} = 80 mm Ø = 0,8 mm	HCl 10 mmol L ⁻¹ metilhidroxietilose 0,1%, pH 2,9 aj. com β-alanina; eletrólito terminal; ácido acético 5 mmol L ⁻¹	CZE	20	Sádelachi et al. (2008)

Legenda: ABPM, ácidos de baixo peso molecular; CZE, eletroforese capilar de zona; L_{ext}, comprimento total do capilar; L_{det}, comprimento efetivo; Ø, diâmetro interno; TBS, tetraborato de sódio; TTAOH, hidróxido de tetradeciltrimetilamônio; PDCA, ácido pirovico; CTAB, cloreto de etiltrimetilamônio.

A separação e identificação de ABPM por eletroforese capilar é em geral conduzida em soluções aquosas de eletrólitos, contendo ânions (co-íon) cromóforos e agentes modificadores da superfície capilar. A presença do cromóforo só se faz necessária em razão do tipo de detecção mais comumente empregada (absorção na região do UV/Vis), onde a maioria dos solutos aniônicos de baixo peso molecular não exibe sinal detectável. Desta forma, a detecção é efetuada indiretamente, pela diminuição momentânea do sinal transiente devido ao deslocamento do ânion cromóforo do eletrólito pelo ânion do soluto, durante passagem deste pelo detector. A adição de um agente modificador da superfície capilar tem por finalidade promover a inversão do fluxo eletrosmótico e redução do tempo de análise (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997).

A comparação das separações de ABPM realizadas por eletroforese capilar e cromatografia iônica, mostra de forma inequívoca o alto desempenho da primeira; outros aspectos relevantes também devem ser considerados: custo e durabilidade das colunas, necessidade de tratamento prévio da amostra, tempo de análise, volume de amostra, e custo final por análise. A conclusão que prevalece em estudos encontrados na literatura é de que a eletroforese capilar apresenta inúmeras vantagens, o que tem contribuído para assegurar uma posição de destaque entre as técnicas analíticas de separação desses tipos de solutos.

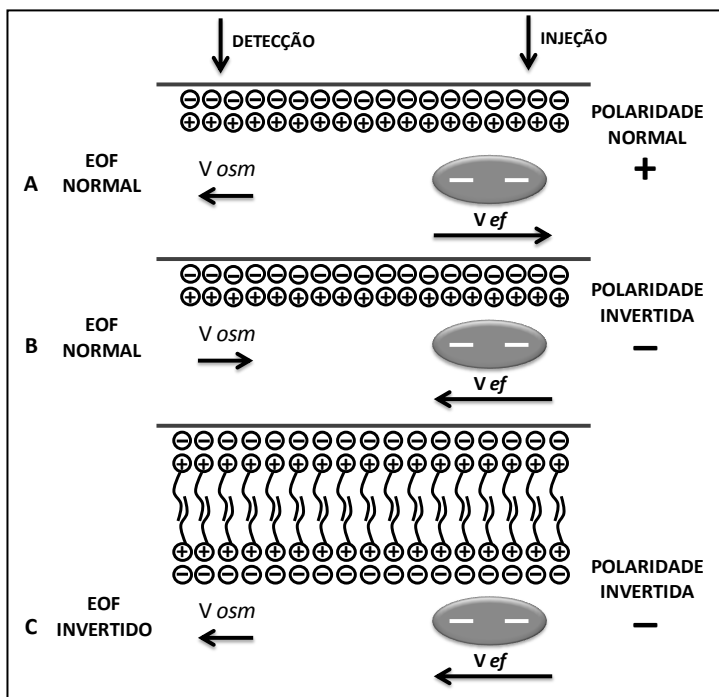
1.3 FLUXO ELETROSMÓTICO E MECANISMOS DE SEPARAÇÃO

A utilização de capilares de sílica fundida em CE introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico (EOF). Os grupos silanol na superfície interna do capilar têm caráter ácido e, em contato com o meio aquoso (pH acima de 2), sofrem dissociação, fazendo com que a carga superficial torne-se negativa, enquanto que os íons H^+ liberados, difundem para o seio da solução que preenche o capilar. Quando a diferença de potencial é aplicada, estes cátions migram em direção ao catodo e, ao migrarem, carregam sua esfera iônica de hidratação, induzindo o aparecimento de um fluxo de líquido no capilar. A presença do fluxo eletrosmótico impõe características intrínsecas à determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar.

A Figura 2 ilustra a influência do fluxo eletrosmótico na análise de ânions, exemplificando os possíveis mecanismos de separação. Em

(A), a separação é conduzida sob fluxo eletrosmótico normal, ou seja, fluxo direcionado ao catodo, representado pelo vetor velocidade v_{osm} . A migração eletroforética dos ânions, v_{ef} , é sempre dirigida ao pólo positivo, sendo o produto da mobilidade do ânion e a força do campo elétrico, de magnitude constante. No entanto, passam pelo detector os ânions maiores (mais lentos), que são arrastados pelo fluxo, por possuírem mobilidade menor que este. Em (B), a polaridade da fonte de alta tensão é invertida; neste caso o detector está posicionado próximo ao anodo e o fluxo eletrosmótico continua direcionado ao catodo (extremidade de injeção). Os únicos ânions a serem detectados são aqueles que apresentam uma mobilidade eletroforética maior que a do fluxo, desta forma, mesmo migrando na direção oposta, esses solutos conseguem eventualmente superá-lo. Ânions com mobilidade igual ou muito semelhante à mobilidade do fluxo não serão detectados, permanecendo imóveis ou migrando muito lentamente no contra-fluxo, fora do tempo estipulado para a detecção. Em (C), o fluxo foi invertido pela adição de um surfactante catiônico, e a polaridade continua invertida. Nesta condição, tanto o fluxo quanto os ânions migram na mesma direção, possibilitando a detecção de todos os componentes da mistura em um tempo apreciavelmente curto.

Figura 2 - Ilustração dos possíveis mecanismos de separação de ABPM por eletroforese capilar.



Fonte: Adaptado de TAVARES (1997).

Muitos tipos de polímeros têm sido empregados na modificação das paredes internas de capilares (LUONG et al., 2005). Um biopolímero que vem sendo recentemente estudado como modificador de capilares é a quitosana (QTS). É um polieletrólito catiônico hidrofílico obtido da reação de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (FU et al., 2007).

Esse biopolímero se caracteriza por apresentar em sua estrutura grupamentos amino que são facilmente protonados, tornando o polímero carregado positivamente, o que permite sua interação com os grupos silanóis da sílica da parede do capilar, modificando o EOF. Além disso, esses grupamentos são relativamente reativos possibilitando a formação de ligações cruzadas entre cadeias de QTS com glutaraldeído, de derivados da QTS e, também, a sua associação com polímeros aniônicos

e surfactantes, que podem ser usados como modificadores, a fim de se obter diferentes perfis de EOF em função do pH, permitindo o emprego destes capilares modificados em diversas aplicações por CE. A versatilidade da QTS e o seu potencial de uso como modificador de capilares foi explorado neste estudo, que tem como objetivo desenvolver um método capaz de separar dez ACAIBPM por eletroforese capilar utilizando ferramentas de simulação para a otimização do método de separação no modo indireto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões utilizados para o preparo de soluções estoque de ácidos (maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, aspártico, succínico e acético) e os reagentes utilizados para composição do eletrólito de corrida (ácido 3,5 dinitrobenzóico e β -alanina) foram da marca Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, E.U.A.). Quitosana com grau de desacetilação de 90% e massa molar média 122,74 kDa foi adquirida da Companhia Purifarma (São Paulo, SP, Brasil), O sal de amônio quaternário de quitosana (SAQQ) foi sintetizado como descrito por Qin et al. (2004) usando QTS e cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA, teor $\geq 90\%$ m/m) adquirido da Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil).. Solução estoque de SAQQ 1,0% (m/v) foi preparada em água ultrapurificada e filtrada em membrana de 0,45 μm e reservada para ser utilizada na modificação da superfície do capilar. Água ultrapurificada Milli-Q[®] foi utilizada para preparo de soluções. O eletrólito de corrida na proporção 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 21 mmol L⁻¹ de β -alanina foi preparado por pesagem direta de 53,0 mg de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 46,7 mg β -alanina em um volume de 25 mL de solução, resultando em pH 3,6 diretamente, não havendo necessidade de ajuste de pH e armazenado sob refrigeração durante o uso. As soluções teste utilizadas estavam na faixa de concentração de 0,21 a 2,1 mmol L⁻¹.

2.2 CAPILAR REVESTIDO COM QTS QUATERNIZADA

A síntese e caracterização da QTS quaternizada foi realizada por Vitali (2012). A modificação da superfície de sílica fundida de tubos capilares utilizando QTS foi realizada como descrito por Huang, (2006). O procedimento de revestimento foi iniciado pelo condicionando do capilar lavando com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ durante 30 min e posteriormente lavando com água deionizada por 15 min para promover a hidratação da superfície do capilar. Após o pré-condicionamento, o capilar foi lavado com solução de QTS quaternizada 0,2% (m/m) por 10 min e mantido em contato estático por mais 10 min, com isso a QTS quaternizada foi adsorvida pelos grupos silanóis presentes na superfície do capilar.

2.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos, (DAD) e sistema de refrigeração por circulação de ar. O *software* HP ChemStation, rev A.06.01 foi utilizado para tratamento e aquisição de dados.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um aspecto interessante da separação de ânions é o efeito do tipo do eletrólito sobre a simetria final da banda. Sempre que a mobilidade do ânion do eletrólito for similar à do ânion do soluto, a banda tende a simetria.. Discrepâncias de mobilidade geram bandas distorcidas, que apresentam *cauda (tailing)* ou *cauda frontal (fronting)*, caso a mobilidade do ânion do eletrólito seja muito maior ou muito menor do que a mobilidade do ânion do soluto, respectivamente (TAVARES; COLAMBARA; MASSARO, 1997). Portanto, a escolha das espécies do eletrólito de corrida é uma etapa crucial na otimização do método, pois está diretamente associada aos fenômenos eletrodispersivos, indesejáveis em uma separação.

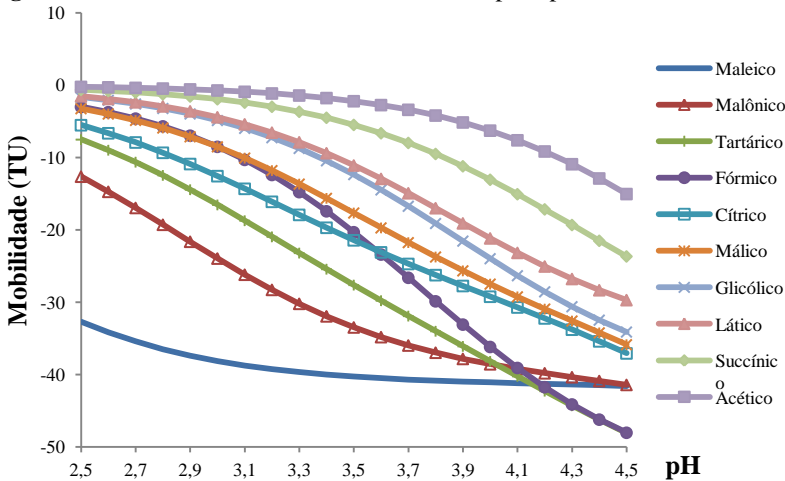
Na Tabela 3 são apresentados os valores dos pK_a e mobilidade eletroforética dos ACAIBPM, comumente encontrados em bebidas destiladas. Esses dados foram extraídos do banco de dados incluído no *software* Peakmaster. Nesta Tabela 3 é possível observar que em pH acima de 4 as espécies já encontram-se dissociadas.

Tabela 3: Valores de pK_a e mobilidade iônica dos ACAIBPM.

Ácido	pK_1	μ_1	pK_2	μ_2	pK_3	μ_3
Acético	4,76	-42,4				
Fórmico	3,752	-56,6				
Maleico	1,921	-41,3	6,225	-62,4		
Málico	3,46	-32,6	5,05	-59		
Malônico	2,847	-40,7	5,696	-67		
Tartárico	3,036	-32,6	4,366	-60,7		
Cítrico	3,128	-28,7	4,761	-54,7	6,396	-74,4
Glicólico	3,886	-42,4				
Lático	3,86	-36,5				
Succínico	4,207	-33	5,638	-60,9		

Fonte: SIMULSC (MICKE, 2004) .

Antes de simular a separação no *software* PeakMaster[®], a escolha do pH de separação deve ser prevista. E isso foi possível a partir da construção de curvas de mobilidades eletroforéticas dos solutos *versus* pH. Estas curvas estão representadas na Figura 3 e foram geradas com o auxílio do aplicativo SIMULSC (MICKE, 2004).

Figura 3: Curvas de mobilidade *versus* pH para os ACAIBPM.

Fonte: SIMULSC (MICKE, 2004)

A partir das curvas de mobilidade foi possível observar, dentro da faixa investigada, que a separação dos compostos pode acontecer entre os valores de pH 3,5 e 3,8. Uma alternativa seria analisá-los no modo contra-eletrosmótico, entretanto a maioria dos ânions apresentam mobilidade eletroforética inferiores a do EOF, de acordo com o perfil de mobilidade do EOF em função do pH, então esses não seriam detectados uma vez que não superariam a mobilidade do fluxo. Em contrapartida, a inversão do EOF propiciaria a detecção de todos os analitos, já que todos os ACAIBPM migrariam com mobilidade anódica pela aplicação de polaridade invertida, fazendo-se então necessária a inversão do EOF para ampliar o número de analitos a serem detectados. Nesta separação foi explorada a utilização de capilar revestido com QTS quaternizada. Com este preenchimento, a mobilidade do EOF observada em função do pH apresenta um perfil sigmoidal, ficando constante e anódico em pH abaixo de 4,7, estando de acordo com o exposto. Essa mobilidade anódica do EOF é resultante da existência de uma densidade de cargas positivas na parede do capilar devido aos grupos amino protonados presentes na cadeia do polímero fixado na parede (VITALI, 2004). Nesta condição, tanto o fluxo quanto os ânions migram na mesma

direção, possibilitando a detecção de todos os componentes da mistura em um tempo apreciavelmente curto.

As características de um eletrólito de corrida adequado incluem uma boa capacidade tamponante e co-íon apresentando mobilidade semelhante a mobilidade média dos analitos de interesse, a fim de minimizar efeitos de assimetria dos picos. Além destes, outros parâmetros que influenciam na separação são facilmente obtidos pelo *software* PeakMaster® (GAŠ et al., 2001; ŠTĚDRÝ, JAROŠ e GAŠ, 2002; ŠTĚDRÝ et al., 2003). Na simulação da separação é considerado o modo de detecção indireta, visto que os analitos apresentam baixa ou nenhuma absorvidade molar. Logo, os componentes do eletrólito de corrida devem absorver na região do UV-Vis.

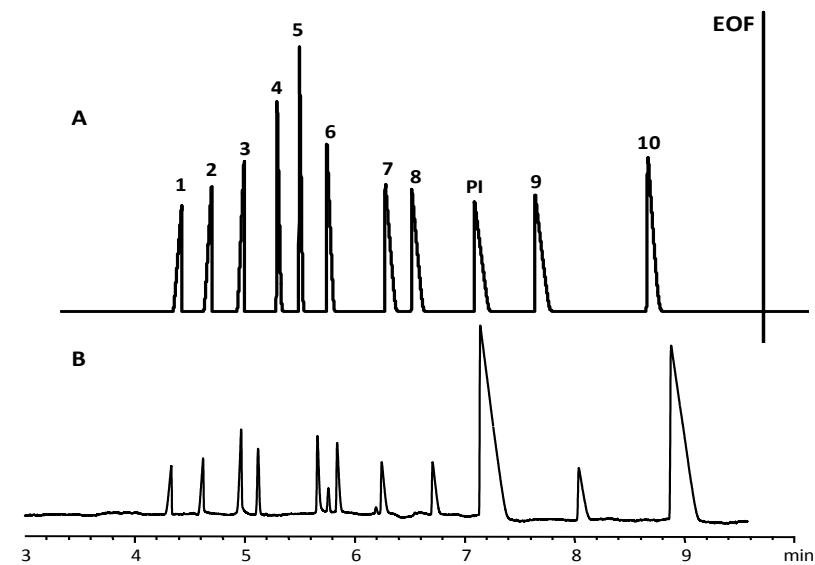
A simulação para a seleção do contra-íon do eletrólito de corrida (componente com carga oposta a dos analitos) foi feita empregando β -alanina; o co-íon escolhido foi o ácido 3,5 dinitrobenzóico, uma vez que o mesmo é cromóforo; ambos apresentam mobilidade intermediária à mobilidade dos analitos e capacidade tamponante nessa faixa de pH.

A escolha de um padrão interno apropriado para a separação foi realizada como auxílio do *software* PeakMaster®. O ânion a ser selecionado como padrão interno deve preencher alguns requisitos: possuir mobilidade efetiva próxima a dos analitos na faixa de pH escolhido; não absorver na região do UV; não sofrer interações com os analitos; e não estar presente na amostra. Um ânion que atendeu a todas essas características foi o ácido aspártico.

A seleção da tensão a ser empregada no método proposto levou em consideração a obtenção de uma separação com menor tempo possível sem interferência pelo aquecimento proveniente do efeito Joule. Interferências como essas podem provocar a deformação das bandas e co-migração dos analitos. A avaliação da existência do efeito Joule foi avaliada verificando se a lei de Ohm é respeitada, e uma boa correlação linear entre a corrente e a tensão para uma dada força iônica ($8,75 \text{ mmol L}^{-1}$) indicou um efeito Joule minimizado.

Para comprovar experimentalmente a simulação realizada com os analitos e o eletrólito de corrida selecionado, foi realizada uma corrida com uma mistura de padrões e comparada com um eletroferograma simulado, os quais estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Eletroferogramas: simulado (A) e de uma mistura de padrões de ACAIBPM na concentração de $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, exceto para os ácidos lático, $0,31 \text{ mmol L}^{-1}$ e para o acético, $2,1 \text{ mmol L}^{-1}$ usando o capilar modificado com QTS quaternizada (B). Condições de separação: injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 3 s; tensão 30 kV; polaridade negativa; eletrólito β -alanina 21 mmol L^{-1} e ácido 3,5 dinitrobenzóico 10 mmol L^{-1} , pH 3,6; capilar $73,5 \text{ cm}$ (L_{tot}), $64,5 \text{ cm}$ (L_{det}), $75 \text{ }\mu\text{m}$ (DI), revestido com QTS quaternizada. Na simulação foram usadas as mesmas condições experimentais e EOF com tempo de 11 min. Ordem de migração: ácidos 1) maleico; 2) malônico; 3) tartárico; 4) fórmico; 5) cítrico; 6) málico; 7) glicólico; 8) lático; PI) aspártico; 9) succínico; 10) acético.



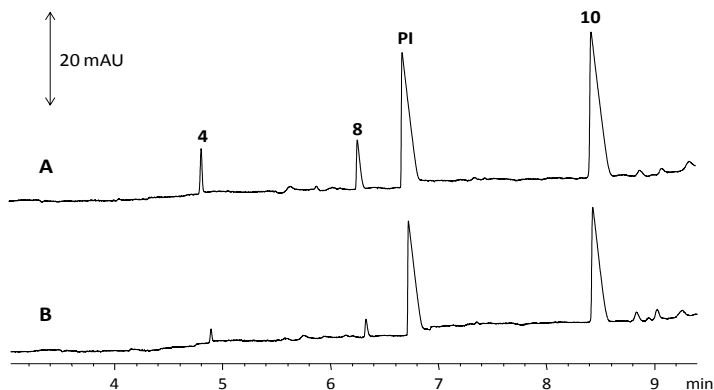
Fonte: (A) Peakmaster® (B) Software Chemstation .

Na Figura 4 pode-se observar que a ordem de migração está de acordo em ambos eletroferogramas (simulado e experimental), havendo uma maior concordância de tempo de migração para os ácidos maleico, malônico, tartárico, málico, aspártico, succínico e acético. A largura da base dos picos são semelhantes, exceto para os ácidos aspártico e acético que estão em concentração maior do que os outros ACAIBPM, dessa forma, a resolução entre os picos também não discorda entre ambas

separações. É importante ressaltar que uma das muitas vantagens do *software* Peakmaster® é que este simula a eletrodispersão, tornando a simulação mais próxima da realidade experimental. O pH que apresentou a resolução completa dos analitos em linha de base em menor tempo foi 3,6. O pico observado no eletroferograma experimental entre os ácidos cítrico e málico é proveniente de contaminação do padrão de ácido lático. Para esta verificação todos os padrões foram analisados isoladamente.

Após serem determinadas as condições de análise dos compostos pesquisados, essa condição foi aplicada às amostras de cachaça envelhecidas e não envelhecidas. O eletroferograma da Figura 5 ilustra a composição de uma amostra avaliada para verificação de possíveis interferentes.

Figura 5: Eletroferograma de uma amostra de (A) cachaça envelhecida 16 anos; e (B) não envelhecida. Para condições experimentais consultar Fig. 4. Ácidos 4) fórmico; 8) lático; PI) aspártico; 10) acético.



Fonte: *Software* Chemstation.

Os resultados obtidos com os eletroferogramas das amostras mostraram que não existem bandas que possam provocar interferência na separação, sendo assim, o método potencialmente pode ser aplicado em amostras de cachaaças após a validação completa do método. A identificação dos picos foi comprovada pela adição dos padrões isoladamente. É possível observar o mesmo perfil de composição para ambas amostras, envelhecidas e não envelhecidas, diferindo apenas na concentração encontrada. Estes compostos já foram confirmados em

trabalhos publicados na literatura (CHEN et al.; 2003; MORENO et al.; 2003, SÁDECKÁ et al., 2008).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a potencialidade da CE aplicada à análise de ânios alifáticos de baixa massa molecular com o uso de capilares revestidos com QTS quaternizada. O preenchimento do capilar com este polímero apresentou-se como uma alternativa ao uso de CTAB para inversão do fluxo eletrosmótico. A otimização da separação permitiu o uso de ferramentas de simulação com sucesso, resultando em análises com tempos relativamente curtos; redução no número de experimentos e, conseqüentemente, dos custos envolvidos com gastos de reagentes e padrões. Com o auxílio do simulador SIMULSC foi possível a construção de curvas de mobilidade para auxiliar na escolha do pH do eletrólito de corrida e, com auxílio do *software* PeakMaster[®], foi possível a simulação dos eletroferogramas com resultados bem próximos a realidade experimental. O método proposto tem potencialidade para ser aplicado na determinação de ACAIBPM em bebidas destiladas, uma vez que esses analitos são comumente encontrados nessas amostras.

REFERÊNCIAS

BRUDIN S. S.; SHELLIE R. A.; HADDAD P. R.; SCHOENMAKERS P. J. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography: Ion chromatography×reversed-phase liquid chromatography for separation of low-molar-mass organic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6742-6746, 2010.

COLOMBARA R.; TAVARES M. F. M.; MASSARO S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 512-518, 1997.

COSTA, A. C. O.; DA COSTA, J. L.; TONIN, F. G. ; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 140-143, 2007.

FU, X.; HUANG, L.; ZHAI, M.; LI, W.; LIU, H. Analysis of natural carbohydrate biopolymer-high molecular chitosan and carboxymethyl chitosan by capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 511-516, 2007.

GALLAGHER, R. S.; ANANTH, R.; GRANGER, K.; BRADLEY, B.; ANDERSON, J. V.; FUERST, E. P. Phenolic and Short-Chained Aliphatic Organic Acid Constituents of Wild Oat (*Avena fatua* L.) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 218-225, 2010.

GAŠ, B.; COUFAL, P. JAROŠ, M.; MUZIKÁŘ, J.; JELÍNEK, I. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model. **Journal of Chromatography A**, v. 905, p. 269 – 279, 2001.

GAŠ, B.; JAROŠ, M.; HRUSKA, V.; ZUSKOVA, I.; STEDRY, M. PeakMaster: a freeware simulator of capillary zone electrophoresis. **LC-GC Europe**, v. 18, p. 282-288, 2005.

HUANG, X.; WANG, Q.; HUANG, B. Preparation and evaluation of stable coating for capillary electrophoresis using coupled chitosan as coated modifier. **Talanta**, v. 69, p. 463-468, 2006.

JURADO-SÁNCHEZ, B.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M. Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. **Talanta**, v. 84, p. 924-930, 2011.

LANDERS, J. P. **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3. ed. Boca Raton: Ed. CRC Press, 2008.

LUONG, J. H. T.; BOUVRETTE, P.; LIU, Y.; YANG, D-Q.; SACHER, E. Electrophoretic separation of aniline derivatives using fused sílica capillaries coated with acid treated single-walled carbon nanotubes. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 187-194, 2005.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol Total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

PIOVEZAN, M.; COSTA, A. C. O.; JAGER, A. V.; DE OLIVEIRA, M. A. L. ; MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. **Analytica Chimica Acta**. v. 673, p. 200-205, 2010.

QIN, C.; XIAO, Q.; LI, H.; FANG, M.; LIU, Y.; CHEN, X.; LI, Q. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 121-126, 2004.

RIZELIO, M. V.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. da S. C.; FRANÇA M., H.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: a possible method for geographic origin discrimination. **Talanta**, 2012 (aceito para publicação).

RIZELIO, V. M.; TENFEN, L.; DA SILVEIRA, R.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 93, p. 62-66, 2012.

SERAFIM, F. A. T., BUCHVISER, S. F., GALINARO, C. A., FRANCO, D. W., NOVAES, F. V. Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; GAŠ, B. Eigenmobilities in back-ground electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigen-peaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, p. 187-198, 2002.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; HRUŠKA, V.; GAŠ, B. Eigenmobili-ties in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3071-3079, 2004.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; VČELÁKOVÁ, K.; GAŠ, B. Eigen-mobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, v. 24, p. 536-547, 2003.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

VITALI, L. **Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar**. 2012. 286 f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

WILLIAMS, W. J.; **Handbook of Anion Determination**. Butterworths; London, 1979).

ZHANG, A.; FANG, Y. L.; MENG, J. F.; WANG, H.; CHEN, S. X.; CHEN, S. X.; ZHANG, Z. W. Analysis of low molecular weight organic acids in several complex liquid biological systems via HPLC with switching detection wavelength. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 449-455, 2011.

CAPÍTULO 3

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CAPILAR PREENCHIDO COM QUITOSANA QUATERNIZADA

1 INTRODUÇÃO

Validação é o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método em avaliação possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação. Constitui o processo de determinação dos parâmetros de desempenho e das limitações de um método, com identificação dos fatores que podem mudar estes parâmetros e em qual extensão (EURACHEM, 1998). Conforme INMETRO (2010) devem ser validados métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, bem como ampliações e modificações de métodos normalizados.

1.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Na Tabela 4 são apresentadas as principais referências relacionadas a processos de validação intralaboratoriais:

Tabela 4 – Principais referências relacionadas a processos de validação intralaboratorias.

Órgão Emitente	Título
<i>United States Foodss and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonization (ICH)</i>	<i>Validation of analytical procedures: methology</i>
<i>European Cooperation for Accreditation of Laboratories (EAL)</i>	<i>EAL-P11. Validation of test methods: general principles and concepts</i>
<i>National Association of Testing Authorities – Australia (NATA)</i>	<i>Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods</i>
<i>Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)</i>	<i>AOAC Peer-verified methods program. Manual on polices and procedures</i>
<i>EURACHEM Working Group. A Focus for Analytical Chemistry in Europe</i>	<i>The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics</i>
<i>Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organization (WHO), CODEX ALIMENTARIUS Committee on methods of Analysis and Sampling (CODEX/CCMAS)</i>	<i>CX/MAS 02/10. Single-laboratory validation of methods of analysis</i>
<i>The Commission of the European Communities (EC)</i>	<i>Commission decision 2002/657/EC</i>
<i>Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), International Standards Oraganization (ISO) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)</i>	<i>Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis</i>
<i>Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Brasil (INMETRO)</i>	<i>DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos</i>

Fonte: Adaptado de SOUZA (2007).

No Brasil a principal referência e órgão fiscalizador de processos de validação é o INMETRO, onde publicou em 2003 o documento *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos* (DOQ-CGCRE-008) também utilizado por órgãos regulamentadores como MAPA (Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento) e

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para validação de métodos analíticos na área de alimentos e bebidas (dentre outras matrizes alimentícias). Este documento apresenta como principais referências utilizadas para sua elaboração a EURACHEM (1998) e normas ISO.

O Laboratório Nacional Agropecuário do estado do Rio Grande do Sul de Análises Físico-Químicas de Bebidas e Vinagres (LABV/LANAGRO-RS), utiliza como referência para validação de métodos analíticos, além daquelas citadas anteriormente, o *Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method (Resolution 10/2005)* do *Compendium of International Analysis of Methods*, da *Organisation Internationale de La Vigne et Du Vin (OIV)*, que provém uma avaliação detalhada em matrizes viníferas.

A abrangência do processo de validação é determinada de acordo com as necessidades, possibilidades, riscos, custos e prazos. Normalmente, procedimentos mais detalhados são realizados para métodos não normalizados e quantitativos, sendo sugeridos parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação pela maioria das referências (SOUZA, 2007). Estes compreendem indicadores quantitativos do bom desempenho de procedimentos experimentais desenvolvidos e aplicados na determinação de substâncias em diversas matrizes (RIBEIRO, 2008).

1.2 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, com um mesmo método, para avaliar a mesma ou diferentes amostras, a diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado, permitindo avaliação de desempenho do método com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo e adaptáveis a diferentes situações. Os princípios básicos de um procedimento de validação intralaboratorial incluem a especificação e escopo, representatividade e verificação de premissas e fontes de erros (SOUZA, 2007).

Segundo INMETRO (2010), os parâmetros que devem ser avaliados e calculados durante o processo de validação para determinação de elementos menores e traços devem conter

fundamentalmente linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, tendência, recuperação, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez.

1.2.1 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método obter resultados de ensaio proporcionais à concentração do analito. A maioria dos equipamentos de medição estabelece a sua faixa dinâmica linear, entretanto, é necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. O modelo e a equação de regressão linear simples encontram-se nas Equações 1 e 2

$$Y_i = \alpha + \beta X_i + \varepsilon_i \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

Y_i = variável dependente ou resposta,

α = interseção,

β = inclinação,

X_i = variável independente ou preditor,

ε_i = resíduo da regressão

$$\hat{y}_i = a + bx_i \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

\hat{y}_i = dependente estimada pela equação da regressão,

a = estimativa da interseção α ,

b = estimativa da inclinação β ,

x_i = concentração conhecida do analito.

O Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) é em grande maioria recomendado pelos protocolos de validação para ajuste

de uma equação, análise de dados, porém, este requer várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo: resíduos são variáveis aleatórias com variância constante e desconhecida, normalmente distribuídos, homoscedásticos (homogeneidade da variância) e independentes (SOUZA, 2005).

A verificação da ausência de valores discrepantes pode ser feita pelo teste de *Grubbs* ou de resíduo *Jacknife*, a distribuição da normalidade pode ser feita pelo teste de *Ryan-Joiner* ou *Shapiro-Wilk* comumente utilizados para $n \cong 20$, a homocedasticidade pelos testes de *Bartlett* (SOUZA, 2007), *Cochran*, *Levene* ou *Brown-Forsythe* (SOUZA, 2005; INMETRO, 2010), a independência pode ser verificada pelo teste de *Durbin-Watson* (SOUZA, 2005) e a avaliação do ajuste ao modelo linear pode ser realizada por teste F de *Snedecor* (SOUZA, 2005; INMETRO, 2010).

O planejamento experimental pode ser elaborado a partir do preparo de uma curva de calibração de branco adicionado de concentrações variadas do analito com três replicatas de preparo de forma independente com, pelo menos, seis níveis de concentração (EURACHEM, 1998).

1.2.2 Faixa de trabalho e faixa linear:

Para todo método analítico, há uma faixa de concentração do analito no qual o método pode ser aplicado. Para fins de planejamento experimental, primeiramente deve ser verificada uma faixa preliminar de interesse, determinada uma faixa de trabalho que deve conter a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado, para posteriormente ser realizada verificação de sua linearidade (EURACHEM, 1998).

1.2.3 Efeito de Matriz

Interferentes podem afetar a inclinação da curva de calibração diferentemente do que seria com o analito de interesse. Este efeito tem o potencial de indicar a possível presença de interferentes desconhecidos, mas não é útil se a curva de recuperação for não linear, pois se faz necessário métodos mais complexos para testes de significância. Se a calibração apresentar linearidade, deve-se comparar as inclinações da equação de calibração usual e do gráfico de adição da matriz, se não houver diferença significativa (a partir da análise utilizando ferramentas estatísticas), não há efeito de matriz. O planejamento experimental pode

ser elaborado a partir do preparo de uma curva de calibração de branco matriz adicionado de concentrações variadas do analito com três replicatas de preparo de forma independente com, pelo menos, seis níveis de concentração, similar ao preparo da calibração usual (EURACHEM, 1998).

1.2.4 Sensibilidade

Alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito ou resposta de um instrumento de medição dividida pela correspondente alteração no estímulo. Este parâmetro pode ser avaliado pela inclinação da curva de calibração, tendo em vista que maior sensibilidade terá o método quando pequenas variações de concentração resultar em uma maior variação de resposta, ou seja, com uma maior inclinação (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

1.2.5 Seletividade/Especificidade

Habilidade de um método em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes na matriz, sob condições de ensaio estabelecidas (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010). A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) dispõe do *software* Peakmaster[®], ferramenta analítica que possibilita a avaliação de parâmetros a serem otimizados durante o desenvolvimento do método e, com conhecimento prévio da composição desta matriz, permite verificar a presença de analitos que poderão atuar como possíveis interferentes na amostra em estudo (GAS, 2005).

1.2.6 Exatidão

Comparação entre a média dos resultados do método com valores conhecidos utilizando verificação contra valores de referência de materiais caracterizados ou de outro método caracterizado. Ou ainda, proximidade de concordância entre o valor médio obtido de um grande conjunto de resultados e um valor de referência aceito. A medida de exatidão é geralmente avaliada em termos de *Recuperação* e esta pode

ser expressa em termos de tendências (desvios). O planejamento experimental pode contemplar a análise de amostras fortificadas com quantidade conhecida do analito de interesse em replicatas. A fração de analito previamente fortificada à amostra para a análise pode ser calculada pela Equação 3 (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010):

$$\%R = [(CF-CU)]/CA]*100 \qquad \text{Equação 3}$$

Sendo:

CF = concentração do analito medido na amostra fortificada,

CU = concentração do analito medido na amostra não fortificada,

CA = concentração do analito adicionado na amostra fortificada.

1.2.7 Precisão

Proximidade da concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos sob condições estipuladas. Depende somente da distribuição de erros aleatórios e não está relacionada ao valor verdadeiro ou especificado. Usualmente é expressa em termos de imprecisão e computada como desvio padrão dos resultados de ensaio. Medidas quantitativas da precisão dependem crucialmente das condições estipuladas, sendo *Repetitividade* e *Reprodutibilidade* formas particulares de condições extremas. O planejamento experimental pode contemplar a análise de padrões ou amostras brancas fortificadas em várias concentrações ao longo da faixa de trabalho (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

1.2.7.1 Repetibilidade

Condições nos quais os resultados de ensaios independentes são obtidos com o mesmo método, em amostras idênticas, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e em curtos intervalos de tempo (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

1.2.7.2 Precisão intermediária

Condições nos quais os resultados de ensaios independentes são obtidos com diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou diferentes tempos um único laboratório, mas sob condições bem

estabelecidas, com pelo menos sete replicatas de preparo independentes (INMETRO, 2010).

1.2.7.3 Reprodutibilidade parcial

Condições nos quais os resultados de ensaios independentes são obtidos com diferentes analistas, diferentes equipamentos em intervalo de tempo estendido, com pelo menos dez replicatas de preparo independentes (EURACHEM, 1998).

1.2.8 Limite de detecção (LD)

LD é a menor concentração do analito ou valor da propriedade que pode ser confiavelmente detectada pelo método. Para propósito de validação é normalmente suficiente prover uma indicação do nível no qual a detecção se torna problemática. Para este propósito, branco+3s é suficiente (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010). O método da relação sinal/ruído para obtenção do limite de detecção pode ser aplicado a procedimentos analíticos que apresentam ruído de linha de base e pode ser estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações do analito de interesse com um sinal de uma amostra branca. Em geral, considera-se aceitável uma relação sinal/ruído 3:1 (RIBEIRO, 2008). O planejamento experimental pode contemplar a análise de dez brancos fortificados independentes com a menor concentração aceitável em termos de incerteza e a avaliação pode ser feita com base no desvio padrão (s) de medidas (EURACHEM, 1998).

1.2.9 Limite de quantificação (LQ)

LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com aceitáveis níveis de exatidão e precisão. Assim como o limite de detecção, o método da relação sinal/ruído pode ser aplicado para o limite de quantificação, onde em geral considera-se aceitável a relação 10:1 (RIBEIRO, 2008). O planejamento experimental pode contemplar a análise de dez brancos fortificados independentes com a menor

concentração aceitável em termos de incerteza e a avaliação pode ser feita com base no desvio padrão (s) de medidas (EURACHEM, 1998).

1.2.10 Robustez

Corresponde a identificação dos estágios do método, os quais se não conduzidos com cuidado suficiente, irão causar severos efeitos na performance do método e podem até mesmo prejudicar seu bom funcionamento. Envolve provocar variações deliberadas ao método e investigar os efeitos subsequentes na performance. (EURACHEM, 1998). Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*, pois trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual influência de cada uma das variações (INMETRO, 2010). No teste de *Youden*, sete parâmetros analíticos são combinados em oito testes, na forma de um planejamento fatorial objetivando determinar a influência de cada parâmetro no resultado final (CÉSAR, 2009).

1.2.11 Padronização interna

O padrão interno (PI) é uma substância utilizada com a finalidade de compensar erros sistemáticos de um ensaio. Uma vez que independe de pequenas variações instrumentais, consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto com características estruturais similares à substância de interesse, que não sofra interações com a mesma, mas não presente na amostra, então chamado de PI. A amostra também é analisada na presença deste PI e, através da razão de áreas (substância pesquisada/PI) obtidas, tem-se a concentração da substância na amostra (RIBANI, 2004; BRASIL, 2003).

1.2.12 *System suitability*

Teste prévio realizado antes de dar início ao procedimento de validação, onde o sistema utilizado para análise é avaliado para verificar sua conformidade a fim de garantir qualidade de resultados. Este teste considera o sistema como um todo: eletroforético, calibração e manutenção do equipamento utilizado e pode ser desenvolvido com a

realização de dez injeções consecutivas de mistura padrão utilizando padrão interno. A avaliação dos resultados pode ser feita por meio do desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade em área, tempo de migração e resolução dos picos (FARIA, 2008).

Este estudo tem como objetivo avaliar os parâmetros de validação intralaboratorial de: linearidade e faixa de trabalho; efeito de matriz; seletividade; repetibilidade; reprodutibilidade parcial; recuperação; limites de detecção e quantificação; e robustez, para determinação de ACAIBPM em amostras de cachaça utilizando eletroforese capilar de zona e capilar de sílica revestido com QTS reticulada. Após avaliação conforme do método, este será utilizado para determinação de ACAIBPM em amostras de cachaça e posterior comparação com resultados obtidos pelo método oficial de determinação de acidez titulável fixa, a fim de demonstrar a potencialidade da técnica para discriminação individual dos ACAIBPM presentes em amostras de cachaça e sua importância no controle de qualidade da bebida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos, (DAD) e sistema de refrigeração por circulação de ar. O *software* HP ChemStation, rev A.06.01 foi utilizado para tratamento e aquisição de dados.

2.2 COLUNAS CAPILARES

Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 75 μm de diâmetro interno com janela de detecção de aproximadamente 0,3 cm, aberta a 8,5 cm da extremidade do capilar, pela remoção do revestimento de poliimida do capilar.

2.3 OUTROS MATERIAIS

Foram utilizados balança analítica AB204-SRS (Mettler Toledo, São Paulo, SP, Brasil), micropipetas de volume variável da marca Labmate (São Paulo, Brasil), balões volumétricos de 10 e 25 mL, tubos plásticos com capacidade para 15 mL e *ependorfs* plásticos com capacidade para 2 mL. Os pacotes estatísticos utilizados foram: Minitab 15 Statistical Software English, Estatística 7.0 e Microsoft Excel 2007.

2.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões utilizados para o preparo de soluções estoque de ácidos (maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, aspártico, succínico e acético) e os reagentes utilizados para composição do eletrólito de corrida (ácido 3,5 dinitrobenzóico e β -alanina) e condicionamento do capilar (hidróxido de sódio) foram da marca Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, E.U.A.), O SAQQ foi sintetizado como descrito por Qin et al., 2004 usando QTS e cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA, teor $\geq 90\%$ m/m) adquirido da Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil). Solução estoque de SAQQ 1,0% (m/v) foi preparada em água ultrapurificada e filtrada em membrana de 0,45 μm e reservadas para serem usadas na modificação da superfície do

capilar. Água ultrapurificada Milli-Q[®] foi utilizada para preparo de soluções, diluição de amostras e condicionamento do capilar. A solução “estoque” *mix* (contendo todos os analitos na concentração ideal para realização da diluição para curva de calibração “trabalho”) foi preparada a partir de soluções “mãe” individuais de 100 mmol L⁻¹ e as concentrações finais de trabalho se encontram Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações dos ACAIBPM da curva de calibração na faixa trabalho.

Compostos	Solução estoque (mg L ⁻¹)	Nível 1 (mg L ⁻¹)	Nível 2 (mg L ⁻¹)	Nível 3 (mg L ⁻¹)	Nível 4 (mg L ⁻¹)	Nível 5 (mg L ⁻¹)	Nível 6 (mg L ⁻¹)	Nível 7 (mg L ⁻¹)
Maleico	34,8	6,97	10,4	13,9	17,4	20,9	24,4	27,8
Malônico	31,2	6,24	9,36	12,5	15,6	18,7	21,8	24,9
Tartárico	45,0	9,01	13,5	18,0	22,5	27,0	31,5	36,0
Fórmico	13,8	2,76	4,14	5,52	6,90	8,28	9,6	11,04
Cítrico	57,6	11,53	17,3	23,0	28,8	34,5	40,3	46,1
Málico	40,2	8,05	12,1	16,1	20,1	24,1	28,2	32,1
Glicólico	22,8	4,57	6,85	9,13	11,4	13,7	15,9	18,2
Lático	40,5	8,11	12,2	16,2	20,2	24,3	28,4	32,4
Succínico	35,4	7,09	10,6	14,2	17,7	21,2	24,8	28,3
Acético	180,0	36,00	54,0	72,0	90,0	108,0	126,0	144,0

Fonte: o próprio autor.

2.5 METODOLOGIAS

2.5.1 Condição experimental para determinação de ACAIBPM por CE

O eletrólito de corrida na proporção 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 21 mmol L⁻¹ de β-alanina foi preparado por pesagem direta de 53,0 mg de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 46,7 mg β-alanina em um volume de 25 mL de solução, resultando em pH 3,6 diretamente, não havendo necessidade de ajuste de pH e armazenado sob refrigeração durante o uso;

A separação dos analitos foi desenvolvida com injeção hidrodinâmica, pressão de 50 mbar por 3 segundos, tensão aplicada de 30 kV, com polaridade negativa, detecção realizada no modo indireto com aquisição de sinal a 254 nm e pré-condicionamento entre corridas de 60 s. O comprimento do capilar de sílica utilizado foi de 73 cm (efetivo

64,5 cm) e 75 μm de diâmetro interno a temperatura de 25°C. O procedimento de preparo do capilar revestido com SAQQ foi realizado de acordo com método descrito por Vitali (2012) modificado, iniciando-se pelo condicionando do mesmo com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ durante 30 min e posteriormente com água desionizada por 15 min para promover a hidratação da superfície do capilar. Após o pré-condicionamento, o capilar foi lavado com solução de QTS quaternizada 0,2% (m/m) por 10 min e mantido em contato estático por mais 10 min, com isso a QTS quaternizada foi adsorvida pelos grupos silanóis presentes na superfície do capilar.

2.5.2 Determinação de Acidez Titulável Total (ATT)

A ATT foi determinada de acordo com o Manual Operacional de Bebidas e Vinagre da Instrução Normativa nº 24 de 8 de setembro de 2005 por titulometria ácido-base (BRASIL, 2005).

2.5.3 System Suitability

Para avaliação do sistema de eletroforese capilar foi preparado um ponto na concentração de 1,5 mmol L⁻¹ a partir de uma solução estoque de 15 mmol L⁻¹ para todos os compostos para as dez repetições de injeção.

2.5.4 Linearidade

A fim de avaliar a faixa linear do método foram preparadas três curvas de calibração aquosas de forma independente, ou seja, cada um dos sete níveis avaliados foram preparados de uma solução estoque diferente, no dia da análise (Tabela 5), e as injeções realizadas de forma aleatória. O MMQO foi utilizado para calcular as estimativas dos parâmetros da regressão; a verificação da ausência de valores discrepantes foi realizada pelo teste de *Grubbs*; a distribuição da normalidade foi feita pelo teste de *Ryan-Joiner*; a homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de *Bartlett*; a independência verificada pelo teste de *Durbin-Watson*; e a avaliação do ajuste ao modelo linear foi realizada pelo teste F de *Snedecor*.

2.5.5 Efeitos de matriz

Para estudos de efeito de matriz foram preparadas três curvas de calibração em matriz cachaça isenta dos ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico e succínico; ácido acético presente em quantidade inferior (15 mg L^{-1}) ao primeiro ponto da curva de calibração para o ácido acético (36 mg L^{-1}), de forma independente, ou seja, cada um dos sete níveis avaliados foram preparados no dia da análise a partir de uma solução estoque diferente, na faixa de concentração de trabalho.

2.5.6 Seletividade

Por meio da ferramenta analítica PeakMaster[®] é possível simular a presença de possíveis compostos interferentes presentes em amostras de cachaças. Os seguintes parâmetros foram preenchidos no *software*: adição dos compostos de composição do eletrólito (10 mmol L^{-1} de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 21 mmol L^{-1} de β -alanina), adição de todos os compostos de interesse (oxálico, maleico, malônico, tartárico, fosfórico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, succínico e acético), tensão (30000 V), comprimento total do capilar (73 cm: efetivo 64,5 cm), polaridade de injeção (negativa), marcador de fluxo (11 min), selecionar correção de força iônica e sinal (direto). Outros ácidos passíveis de serem encontrados em bebidas destiladas também foram adicionados à simulação para detectar possíveis interferentes.

2.5.7 Limites de detecção e quantificação

A identificação do LD foi realizada por meio da análise de supostas menores concentrações aceitáveis e verificada a concentração que apresentasse a relação sinal/ruído de 3:1, para então preparar 10 replicatas independentes desta concentração e avaliar o DPR (%).

A identificação do LQ foi realizada por meio da análise de supostas menores concentrações aceitáveis e verificada a concentração que apresentasse a relação sinal/ruído de 10:1 para então preparar 10 replicatas independentes desta concentração e avaliar o DPR (%).

2.5.8 Repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação

Para avaliação da repetibilidade foram analisadas 10 replicatas independentes para os 7 níveis da curva de calibração dos ACAIBPM, utilizando a mesma metodologia, mesmo equipamento, preparadas pelo mesmo analista em um mesmo dia.

Para avaliação da reprodutibilidade parcial foram analisadas primeiramente, 10 replicatas independentes para os 7 níveis da curva de calibração dos ACAIBPM, utilizando a mesma metodologia, mesmo equipamento, preparadas pelo mesmo analista com um intervalo de 7 dias. Após, foram analisadas 10 replicatas independentes para os 7 níveis da curva de calibração dos AAIBPM, utilizando a mesma metodologia, mesmo equipamento, preparadas por diferente analista e com intervalo de 14 dias.

A avaliação da exatidão do método foi feita pela fortificação das concentrações dos 7 níveis da curva de calibração dos AAIBPM, com 6 replicatas de preparo independentes.

2.5.9 Robustez

Para avaliar a robustez do método foi utilizado o teste de *Youden*, onde os parâmetros analíticos combinados por meio de um planejamento fatorial são utilizados para determinar a influência de cada parâmetro. Foram injetados o padrão nível 5 da curva de calibração dos ACAIBPM e 1 amostra de cachaça 1-E16A e injetados em triplicata sob cada condição gerada pelo planejamento fatorial envolvendo condição nominal e condição alterada. Os 7 parâmetros analíticos selecionados para esta avaliação foram tensão, pH, temperatura, pressão, comprimento de onda, tempo de lavagem e tempo de injeção.

2.5.10 Preparo de amostras

As amostras foram fornecidas por empresas locais e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e foram identificadas como: 1-2NE (fornecedor 1, amostra nº 2: não envelhecida), 1-3NE (fornecedor 1, amostra nº 3: não envelhecida), 1-E3A (fornecedor 1, amostra envelhecida 3 anos), 1-E4A (fornecedor 1, amostra envelhecida 4 anos), 1-E6A (fornecedor 1, envelhecida 6 anos), 1-E12A (fornecedor 1, envelhecida 12 anos), 1-E16A (fornecedor 1, envelhecida 16 anos), 2-E3A (fornecedor 2, envelhecida 3 anos), 2-E5A (fornecedor 2,

envelhecida 5 anos), 3-E3A (fornecedor 3, envelhecida 3 anos), 3-E2A1 (fornecedor 3, envelhecida 2 anos, amostra 1), 30E2A2 (fornecedor 3, envelhecida 2 anos, amostra 2). As amostras foram diluídas (1:9, v/v) com padrão interno ácido aspártico na concentração final e constante em todas as análises de 200 mg L^{-1} , e realizada injeção no equipamento diretamente.

3 DISCUSSÃO E RESULTADOS

3.1 SYSTEM SUITABILITY

Previamente à realização dos ensaios, foi realizado o teste de *system suitability* para verificar a conformidade do sistema e os resultados foram expressos como DPR% e podem ser observados na Tabela 6:

Tabela 6 - Teste de *System suitability*

	Ácidos									
	Male	Malo	Tar	For	Cit	Mal	Gli	Lat	Suc	Ace
t_m	0,19	0,16	0,15	0,12	0,09	0,07	0,05	0,02	0,04	0,12
Razão	1,67	1,20	0,47	1,30	1,14	1,74	0,89	0,68	0,87	0,94

$n = 10$; t_m , tempo de migração; Razão, razão das áreas analito/PI.

Fonte: o próprio autor.

Os resultados observados na Tabela 6 apresentaram variação de DPR de 0,02 a 0,19% para o tempo de migração (t_m) e 0,47 a 1,74% para a razão das áreas. Os valores baixos para DPR% demonstram que o sistema instrumental encontra-se adequado para ser inserido ao processo de validação.

3.2 LINEARIDADE

Primeiramente foram gerados os gráficos de regressão linear para cada composto onde os coeficientes de determinação para todos os ácidos apresentaram valores $> 0,99$, exceto para o ácido tartárico, $> 0,97$, confirmando a linearidade pelo método visual.

Os gráficos de resíduos foram gerados para verificação de valores discrepantes visualmente (Figura 6) e a confirmação destes foi verificada pelo teste de *Grubbs*, onde para $n = 3$ e nível de confiança de 95%, o valor crítico $G(1)$ corresponde a 1,15.

Figura 6 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão da curva de calibração de ACAIBPM em matriz aquosa.

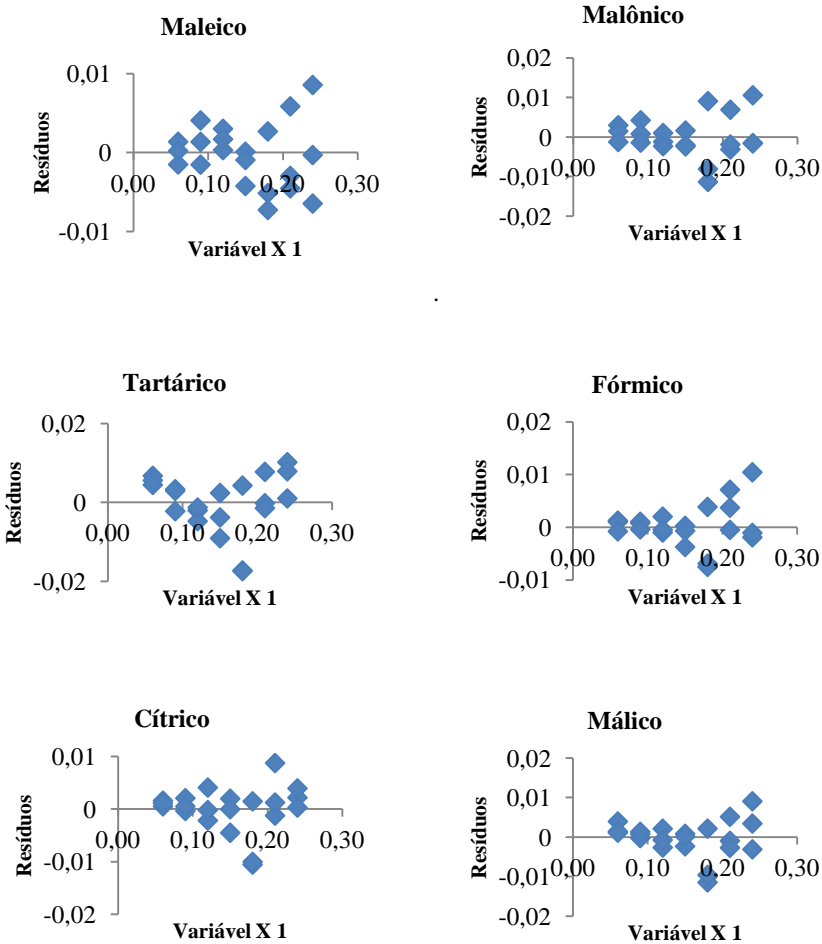
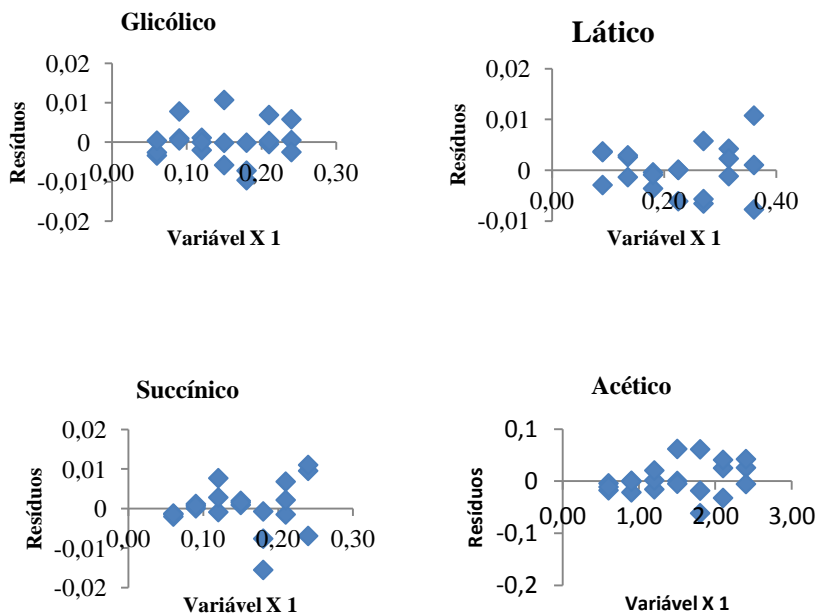


Figura 6 (Continuação)- Gráficos de resíduos para avaliação da regressão da curva de calibração de ACAIBPM em matriz aquosa.



Fonte: *Microsoft Excel*

A fim de realizar uma análise efetiva de possíveis pontos discrepantes presentes nas replicatas de níveis da curva de calibração foi utilizado o teste de *Grubbs*, que conforme Burke (2001), a presença de um único possível ponto discrepante pode ser calculado pela Equação 4:

$$G1 = |\bar{x} - x_i| / s \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

\bar{x} = média das replicatas

x_i = replicata suspeita de ser ponto discrepante

s = desvio padrão das medidas de replicata

O número de valores discrepantes observados visualmente nas replicatas de cada nível para cada ácido, e o número de valores

confirmados pelo teste de *Grubbs* foram respectivamente, maleico: 3 e 0; malônico: 3 e 1(1 replicata do nível 7); tartárico: 2 e 1(1 replicata do nível 5); fórmico: 2 e 0; cítrico: 2 e 1(1 replicata do nível 5); málico: 1 e 0; glicólico: 1 e 0; lático: 2 e 0; succínico: 2 e 0; acético: 2 e 0.

A avaliação da premissa de distribuição normal dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de *Ryan-Joiner* (Figura 7). Os coeficientes de correlação (RJ) obtidos para os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, succínico e acético foram 0,991; 0,982; 0,963; 0,980; 0,971; 0,982; 0,986; 0,984; 0,983; 0,980, respectivamente, indicando correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos e os valores normais teoricamente esperados, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo em um intervalo de confiança de 90% ($p > 0,10$).

Figura 7 - Gráficos do teste de *Ryan-Joiner* para avaliação da distribuição normal dos resíduos da regressão da curva de calibração de ACAIBPM em matriz aquosa.

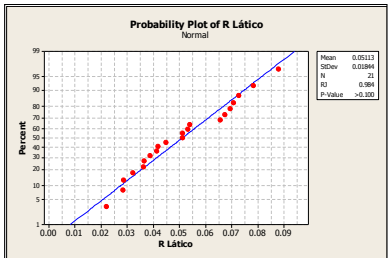
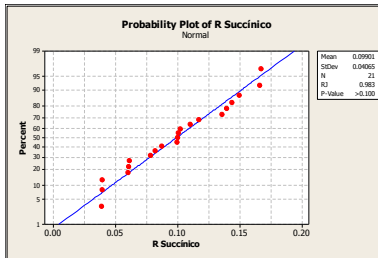
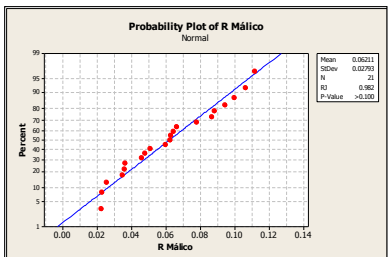
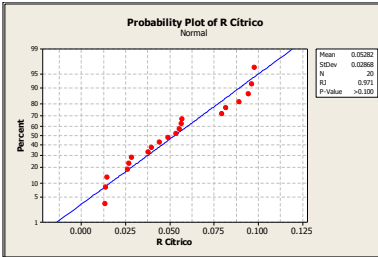
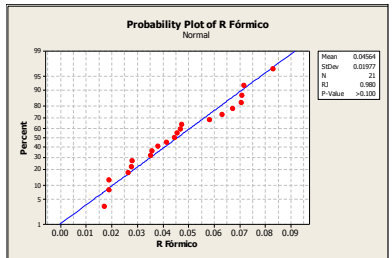
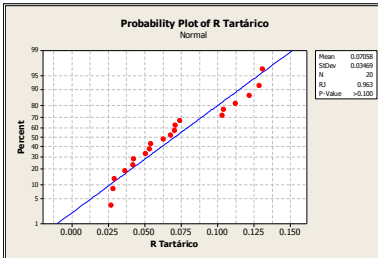
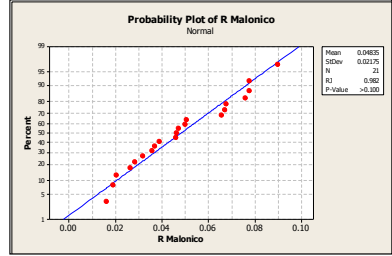
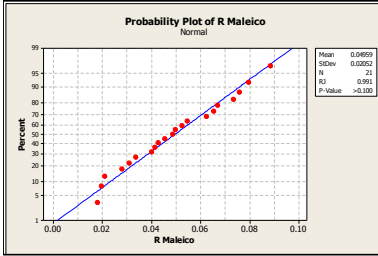
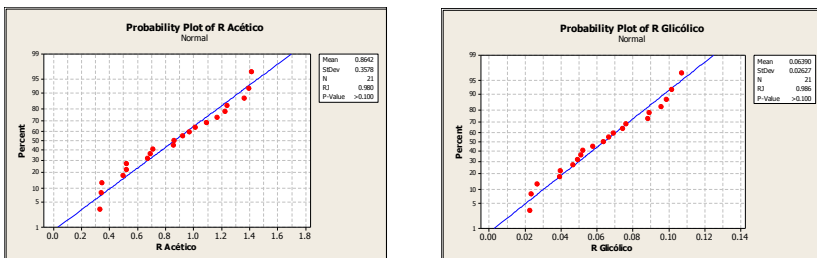


Figura 7 (Continuação) - Gráficos do teste de *Ryan-Joiner* para avaliação da distribuição normal dos resíduos da regressão da curva de calibração de ACAIBPM em matriz aquosa.



Fonte: Minitab

A avaliação da premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi realizada pela estatística de *Bartlett*. As estatísticas *t* para os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico e acético foram 0,238; 0,138; 0,118; 0,067; 0,111; 0,103; 0,474, 0,310 e 0,173, respectivamente, confirmando homoscedasticidade para estes compostos com $p > 0,05$, porém para o ácido succínico o valor da estatística *t* encontrado foi de 0,001, com $p < 0,05$, confirmando heteroscedasticidade para este analito.

A avaliação da premissa de autocorrelação dos resíduos da regressão foi realizada pelo teste de *Durbin-Watson* resultando em estatísticas (d_w) para os ácidos maleico e malônico de 1,04 e 0,78, respectivamente, demonstrando dependência dos resíduos para estes compostos; já para os ácidos tartárico, fórmico, málico e acético obteve-se valores de 1,08; 1,15; 1,21 e 2,75, respectivamente, demonstrando resultado inconclusivo; e apenas para os ácidos cítrico, glicólico, láctico e succínico obteve-se os valores de 1,36; 1,59; 1,74 e 2,32, respectivamente, demonstrando independência entre os resíduos da regressão para $\alpha = 0,05$. Os valores obtidos foram avaliados através da tabela de valores críticos de *Durbin-Watson* (DURBIN; WATSON, 1951) com limite inferior (d_L) de 1,08, limite superior (d_U) de 1,28 para vinte e vinte e um pontos, uma variável predita e nível de significância $\alpha = 0,05$; e conforme a interpretação da relação: $0 \leq d_w < d_L$ significa dependência (rejeitar H_0), $d_L \leq d_w \leq d_U$ o teste é inconclusivo, se $d_U < d_w$

$< 4 - d_U$ não rejeita-se H_0 (independência), se $4 - d_L \leq d_w \leq 4$ o teste é inconclusivo e se $4 - d_U \leq d_w \leq 4$ rejeita-se H_0 (dependência).

3.3 EFEITO DE MATRIZ

Objetivando quantificar os ácidos fórmico, láctico e acético, compostos identificados nas amostras de cachaças previamente, pelo método de adição de padrão, optou-se por avaliar os efeitos de matriz nestes compostos. Foram gerados os gráficos de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) para estes ácidos obtendo-se os valores de 0,99; 0,94 e 0,98, respectivamente. O MMQO foi utilizado para calcular as estimativas dos parâmetros de regressão. Valores discrepantes foram investigados por inspeção visual (Figura 8) e confirmados pelo teste de *Grubbs*, onde não foram identificados valores discrepantes.

Figura 8 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão da curva de calibração dos ácidos fórmico, láctico e acético em matriz cachaça.

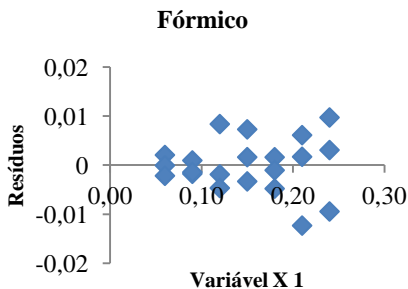
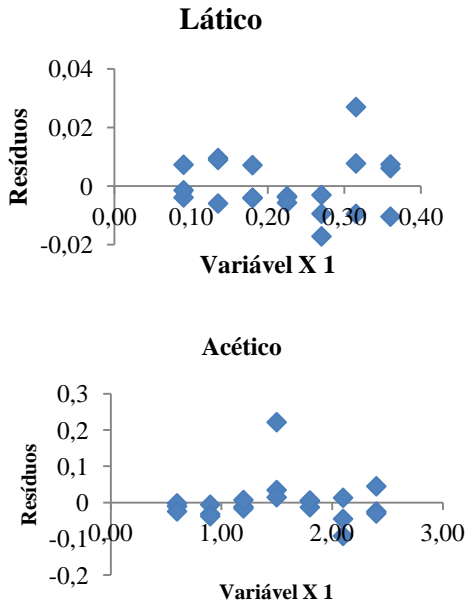


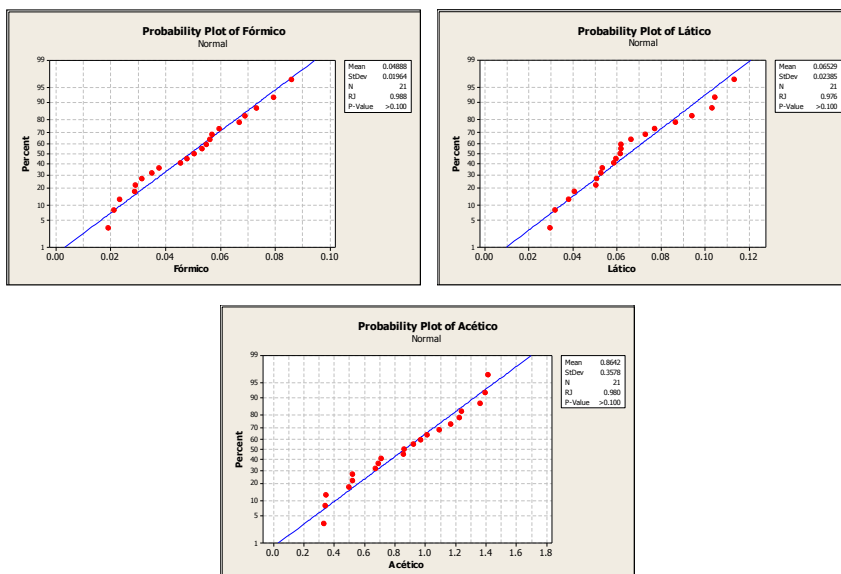
Figura 8 (Continuação) - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão da curva de calibração dos ácidos fórmico, lático e acético em matriz cachaça.



Fonte: *Microsoft Excel*

A avaliação da premissa de distribuição normal dos resíduos da regressão para curva matriz foi confirmada pelo teste de *Ryan-Joiner* (Figura 9). Os coeficientes de correlação (RJ) obtidos para os ácidos encontrados nas cachaças estudadas (fórmico, lático e acético) foram 0,988; 0,976 e 0,980, respectivamente, indicando correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos e os valores normais teoricamente esperados, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo em um intervalo de confiança de 90% ($p > 0,10$).

Figura 9 - Gráficos do teste de *Ryan-Joiner* da regressão da curva de calibração dos ácidos fórmico, láctico e acético em matriz cachaça.



Fonte: Minitab

A avaliação da premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi realizada pela estatística de *Bartlett*, onde as estatísticas t para os ácidos fórmico, láctico e acético foram 0,988, 0,976 e 0,980, confirmando homoscedasticidade para os compostos com $p > 0,05$. A avaliação da premissa de autocorrelação dos resíduos da regressão foi realizada pelo teste de *Durbin-Watson* resultando em estatísticas (d_w) para os ácidos fórmico, láctico e acético os valores de 0,832; 1,831 e 1,734 respectivamente, demonstrando dependência dos resíduos apenas para o ácido fórmico e, uma vez que para a curva aquosa, o resultado da independência foi inconclusivo, pode-se inferir tendência à dependência de resíduos da regressão para este composto.

Na Tabela 7 é apresentada a avaliação do parâmetro linearidade para os ácidos fórmico, láctico e acético para as curvas aquosa e matriz.

Tabela 7 - Avaliação do parâmetro linearidade para os ácidos Formico/Lático/Acético (For/Lat/Ace) para curvas aquosa e matriz.

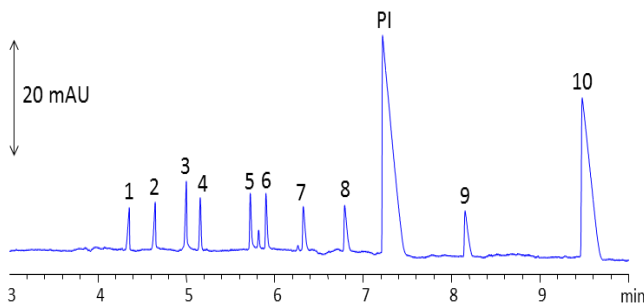
Estatística	Curva Aquosa	Curva Matriz
	For/Lat/Ace	For/Lat/Ace
<i>Número de observações</i>		
<i>n</i>	21/21/21	21/21/21
<i>Normalidade</i>		
<i>R</i>	0,980/0,984/0,980	0,988/0,976/0,980
<i>p</i>	<i>p</i> > 0,10	<i>p</i> > 0,10
<i>Homoscedasticidade</i>		
<i>t_B</i>	11,8/7,11/9,00	8,26/8,91/ 6,35
<i>p</i>	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
<i>Independência</i>		
<i>d_w</i>	1,15/1,74,2,75	0,832/1,831/1,734
<i>p</i>	<i>d_L</i> = 1,08 e <i>d_V</i> = 1,28	<i>d_L</i> = 1,08 e <i>d_V</i> = 1,28
<i>Regressão</i>		
<i>F</i>	683/293/2477	230/95/581
<i>p</i>	4,6 x 10 ⁻¹⁸ /5,1 x 10 ⁻¹³ / 4,1 x 10 ⁻²⁴	4,5 x 10 ⁻¹² /7,5 x 10 ⁻⁹ / 1,0 x 10 ⁻¹⁵
<i>Inclinação</i>		
<i>F</i>	0,736/0,702/0,205	
<i>p</i>	0.424/0,412/0,170	

Legenda: *n*, número de medidas; *R*, coeficiente de correlação de RJ, *F*, razão entre variâncias, *p*, nível de significância, For, Fórmico, Lat, Lático, Ace, Acético. Fonte: o próprio autor.

Os dados obtidos da Tabela 7 foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear para os ácidos lático e acético, sendo apenas a premissa de independência não atendida para o ácido fórmico; houve significância de regressão ($p < 0,001$) e não houve diferença significativa entre as inclinações das curvas ($p > 0,05$), indicando linearidade na faixa de 2,76 a 11,04 mg L⁻¹ para fórmico; 8,11 a 32,4 mg L⁻¹ para lático e 36 a 144 mg L⁻¹ para acético em ambas as curvas.

Também pôde-se observar que não houve diferença significativa entre as médias amostrais da regressão, sendo possível inferir que a curva aquosa forneceu as mesmas respostas que a curva em matriz. Uma vez que não se dispõe de matriz isenta dos analitos de interesse, foi possível concluir que pode ser utilizada curva de calibração aquosa para o processo de validação intralaboratorial. Eletroferograma típico para curva aquosa e matriz encontra-se na Figura 10.

Figura 10 - Separação dos ACAIBPM. Condições de análise: 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 21 mmol L⁻¹ de β-alanina; injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar durante 3 segundos; tensão, -30 kV; comprimento do capilar revestido com SAQQ, 73 cm (efetivo 64,5 cm) e 75 μm de diâmetro interno; temperatura, 25°C; detecção no modo indireto em 254 nm. Ácido: (1) maleico; (2) malônico; (3) tartárico; (4) fórmico; (5) cítrico; (6) málico; (7) glicótico; (8) láctico; (9) succínico; (10) acético. Padrão interno (PI), ácido aspártico.



Fonte: *Software* Chemstation.

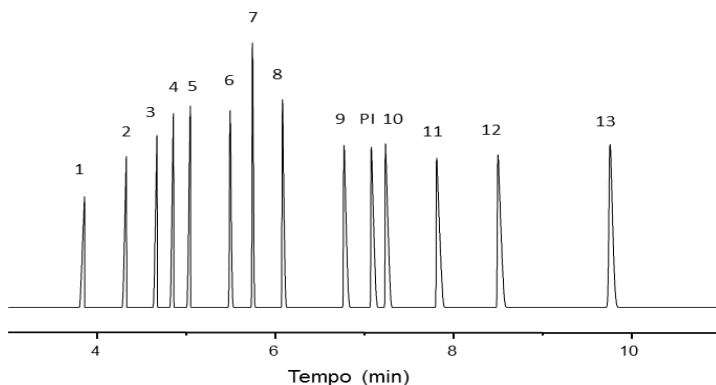
Além dos parâmetros já avaliados para verificação da conformidade do sistema linearidade e efeito de matriz, os seguintes parâmetros foram avaliados no procedimento de validação intralaboratorial: seletividade, LD, LQ, repetibilidade, reprodutibilidade parcial, recuperação e robustez.

3.4 SELETIVIDADE

Para avaliação deste parâmetro se fez uso do *software* PeakMaster[®], onde foram adicionados compostos possíveis interferentes em amostras em cachaças (SÁDECKÁ et al., 2008) como as ácidos

oxálico, fosfórico e glucônico. Esta simulação é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Eletroferograma simulado com 14 compostos adicionados incluindo os ácidos oxálico (1), fosfórico (4) e glucônico (11). Ácido: (2) maleico; (3) malônico; (5) tartárico; (6) fórmico; (7) cítrico; (8) málico; (9) glicólico; (10) láctico; (12) succínico; (13) acético. Padrão interno (PI), ácido aspártico.



Fonte: Peakmaster®

Observando o eletroferograma da simulação na Figura 11, pode-se verificar uma boa separação como resultado da avaliação para três compostos adicionados como possíveis interferentes: oxálico (1), fosfórico (4) e glucônico (11).

3.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO, REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL

Os valores de LD e LQ se encontram na Tabela 12 e apresentaram similaridade com valores encontrados por alguns pesquisadores para o CZE (FUNG, LAU, 2003; MORENO, 2003) e abaixo dos valores encontrados por Esteves et al. (2004). Os valores de DRP encontrados para os compostos foram de 4,9 a 9,4% para LD e de 3,8 a 7,7% para LQ, demonstrando uma baixa variação para os valores estipulados pela relação sinal/ruído, considerado aceitável pelo critério

estipulado de 15% para LQ e 20% para LD (BRASIL, 2003). Os valores para a avaliação da repetibilidade, reprodutibilidade parcial (DPR) e recuperação (%) encontram-se na Tabela 13. Na avaliação de repetibilidade e reprodutibilidade parcial obtiveram-se valores de 2,16 a 12,7% e 1,70 e 10,5%, respectivamente, demonstrando uma variabilidade aceitável para o método, considerando critério estipulado de 15% (BRASIL, 2003; SOUZA, 2007). Na avaliação de recuperação obtiveram-se valores de 89,6 a 145,5%, sendo que, se considerado o critério de aceitação de desvio de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003), os níveis das curvas de calibração e seus respectivos compostos: 1 (Málico), 2 (Glicólico), 1 e 2 (Lático), estariam fora do critério de aceitação. Cabe ressaltar que, mesmo após testes desenvolvidos com até 3 padrões analíticos de ácido láctico, alto grau de pureza, um interferente localizado no eletroferograma, entre os compostos ácidos cítrico e málico, não pôde ser eliminado. Uma avaliação por ressonância magnética nuclear (RMN) do padrão analítico de alto grau de pureza evidenciou impureza ao reagente recentemente adquirido para implementação da metodologia, que apresentou o comportamento similar para outros 2 padrões analíticos testados. Portanto, por desconhecer o composto interferente detectado e seu nível de influência no desempenho do método, pode-se inferir esta contaminação como possível causa para o alto valor apresentado na recuperação da adição padrão para o composto ácido láctico.

Tabela 12 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os ACAIBPM para 10 preparações independentes (n=10).

Parâmetro	Male	Malo	Tar	For	Cit	Mal	Gli	Lat	Suc	Ace
LD	1,74	3,12	2,25	0,69	5,76	4,02	2,28	2,70	1,77	1,80
DPR(%)	4,9	7,2	9,4	6,2	6,4	7,4	6,1	7,4	8,4	6,9
LQ	6,97	6,24	9,01	2,76	11,5	8,04	4,57	8,11	7,09	5,40
DPR(%)	7,7	7,2	6,2	8,1	3,8	5,4	6,5	8,6	4,0	7,6

Legenda: LD e LQ (mg L^{-1}); DPR (desvio padrão relativo: %),

Fonte: o próprio autor.

Tabela 13 – Valores de DPR (%) para os parâmetros de avaliação do método quanto à precisão (repetibilidade e reprodutibilidade parcial) e exatidão do método (recuperação).

	Male	Malo	Tar	For	Cit	Mal	Gli	Lat	Suc	Ace
Níveis	Repetibilidade*									
1	5,92	12,4	12,9	6,52	10,5	10,9	8,40	8,35	5,15	5,38
2	6,65	8,69	6,99	6,34	9,90	11,5	9,28	6,95	6,84	4,67
3	5,01	8,96	4,81	6,71	8,90	12,7	4,69	5,81	5,25	4,74
4	5,77	8,24	8,92	7,94	8,78	10,7	7,93	4,98	3,37	2,63
5	3,46	9,48	4,47	4,77	11,3	7,64	6,08	3,39	3,63	4,15
6	5,73	9,02	5,11	4,68	9,59	7,90	4,34	2,89	4,85	5,33
7	4,95	9,34	5,94	4,20	10,9	7,80	4,87	4,30	2,16	4,08
Níveis	Reprodutibilidade parcial: dias diferentes*									
1	3,67	7,09	8,29	7,49	8,20	6,99	4,87	5,94	5,91	4,98
2	4,72	7,06	6,21	4,75	6,43	5,79	7,87	7,71	4,05	2,76
3	4,34	6,15	3,74	5,52	6,04	3,67	4,22	8,19	4,20	4,38
4	6,47	3,75	4,28	6,40	8,44	4,27	4,15	5,16	2,83	3,38
5	3,67	4,87	3,84	4,04	5,83	3,08	5,56	7,79	4,36	5,32
6	5,08	7,66	8,38	7,43	9,81	6,30	5,08	6,40	4,54	3,96
7	2,89	6,30	4,36	6,48	7,59	3,21	3,02	5,75	2,60	1,70
Níveis	Reprodutibilidade parcial: dias diferentes e analista diferente									
1	4,02	5,24	7,30	6,60	6,62	8,85	8,74	10,5	5,09	5,86
2	4,89	5,85	5,76	5,98	7,17	6,71	8,58	8,74	5,65	5,24
3	2,65	3,50	2,58	4,78	5,66	5,36	6,54	5,25	2,32	2,04
4	3,09	2,26	2,66	3,88	6,08	4,62	4,13	5,74	2,35	1,78
5	6,14	8,10	6,05	5,78	8,59	7,28	8,86	8,09	6,54	6,62
6	1,85	3,22	3,27	3,16	3,15	3,81	3,70	3,81	2,86	2,43
7	3,09	3,34	3,79	3,57	4,46	4,48	4,37	4,51	3,19	1,92
Níveis	Recuperação (%)									
1	108,3	110,7	109,6	117,9	104,1	130,5	122,7	133,5	112,3	91,5
2	103,1	105,0	102,1	109,6	93,7	105,7	126,0	145,5	99,6	89,6
3	103,8	103,2	101,0	111,1	94,3	106,9	116,2	123,8	105,3	93,1
4	98,1	106,1	107,3	111,7	96,6	106,9	118,4	122,8	95,1	104,6
5	101,7	101,4	100,0	103,9	97,8	108,5	110,5	105,5	99,2	93,7
6	109,3	106,2	103,4	103,3	107,4	108,0	123,1	128,2	100,1	90,3
7	99,4	100,2	99,1	106,5	96,9	104,1	121,2	138,3	99,9	93,4

n = 10; parâmetros avaliados nos 7 níveis da curva de calibração.

Fonte: o próprio autor.

3.6 ROBUSTEZ

A avaliação do parâmetro de desempenho robustez foi realizada conforme teste de *Youden*. Na Tabela 14 são apresentadas as condições nominais do método desenvolvido e as condições alteradas (variações) utilizadas:

Tabela 14 - Parâmetros analíticos e variações para avaliação do parâmetro robustez do método para quantificação de ácido alifáticos.

Parâmetro analítico	Condição Nominal	Condição alterada
Tensão	30 kV (A)	25 kV (a)
pH	3,63 (B)	3,73 (b)
Temperatura	25°C (C)	20°C (c)
Pressão	50 mbar (D)	55 mbar (d)
Comprimento de onda	254 nm (E)	258 nm (e)
Tempo de lavagem entre corridas	60 s (F)	30 s (f)
Tempo de injeção	3 s (G)	4 s (g)

Fonte: o próprio autor.

A combinação fatorial dos parâmetros analíticos utilizada para o teste de *Youden* é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15: Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão	A	A	A	A	a	a	a	a
pH	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura	C	c	C	c	C	c	C	c
Pressão	D	D	d	d	d	d	D	D
Comprimento de onda	E	e	E	e	E	e	E	e
Tempo de lavagem	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de injeção	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Legenda: A, B, C, D, E, F e G: condições nominais; a, b, c, d, e, f e g: condições alteradas dos parâmetros analíticos referentes; s, t, u, v, w, x, y e z: resultados referentes às combinações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Fonte: o próprio autor.

Os resultados obtidos em oito análises para soluções padrão e amostra são apresentados na Tabela 16 para os ácidos fórmico, láctico e acético. Avaliando os valores apresentados para o ácido fórmico, foi possível verificar valores discrepantes para os resultados obtidos para solução padrão com relação aos fatores resposta área, concentração e simetria na condição 8 e, para o fator resposta simetria na condição 7, que podem ser justificados pela co-migração dos ácidos fórmico e láctico na condição de pH avaliada. Com a verificação dos valores apresentados para os compostos láctico e acético, foi possível observar valores aproximados para os fatores resposta no que diz respeito às condições aplicadas à solução amostra e solução padrão.

A fim de avaliar o efeito de cada parâmetro, a média dos quatro valores correspondentes às condições alteradas foi subtraída do valor médio dos quatro valores obtidos das condições nominais conforme exemplo apresentado na Equação 5. Esta subtração é apresentada nas

Tabelas 17, 18 e 19 para ácidos fórmico, láctico e acético, respectivamente.

Tabela 16: Resultados médios obtidos nas oito condições analíticas para avaliação da robustez dos parâmetros área, t_m , concentração, simetria e resolução em amostra de cachaça e padrão para os ácidos fórmico, láctico e acético.

Fórmico Condição	Área (razão PI)		t_m (razão PI)		Concentração (nmol L ⁻¹)		Simetria		Resolução	
	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão
1	0,039	0,059	0,698	0,730	0,129	0,157	0,949	0,887	33,7	13,3
2	0,039	0,050	0,717	0,724	0,128	0,162	0,944	1,03	31,7	15,2
3	0,042	0,050	0,732	0,745	0,138	0,159	1,25	1,29	29,2	16,0
4	0,040	0,050	0,712	0,717	0,131	0,161	1,31	1,14	34,2	19,9
5	0,043	0,049	0,733	0,745	0,139	0,157	0,889	0,887	28,2	12,7
6	0,039	0,051	0,703	0,706	0,129	0,163	0,962	0,985	33,3	14,3
7	0,042	0,057	0,716	0,725	0,137	0,180	1,06	1,42	32,4	15,7
8	0,040	0,125	0,717	0,724	0,130	0,375	1,41	2,84	31,4	14,3
Lático Condição	Área (razão PI)		t_m (razão PI)		Concentração (nmol L ⁻¹)		Simetria		Resolução	
	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão
1	0,082	0,079	0,933	0,944	0,189	0,184	0,418	0,312	4,92	3,45
2	0,091	0,081	0,937	0,942	0,206	0,187	0,310	0,268	13,1	3,40
3	0,092	0,080	0,944	0,949	0,210	0,185	0,271	0,269	3,49	2,86
4	0,087	0,079	0,935	0,938	0,199	0,183	0,319	0,289	4,68	4,05
5	0,088	0,079	0,945	0,950	0,200	0,184	0,287	0,312	3,40	2,80
6	0,088	0,079	0,932	0,935	0,201	0,183	0,380	0,343	4,70	3,89
7	0,087	0,079	0,938	0,942	0,198	0,182	0,381	0,308	4,69	3,76
8	0,088	0,078	0,937	0,940	0,202	0,180	0,321	0,297	4,23	3,63
Acético Condição	Área (razão PI)		t_m (razão PI)		Concentração (nmol L ⁻¹)		Simetria		Resolução	
	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra	Padrão
1	0,688	0,778	1,32	1,27	1,32	1,48	0,181	0,123	16,7	9,71
2	0,666	0,768	1,28	1,27	1,28	1,46	0,166	0,117	10,2	8,59
3	0,695	0,812	1,28	1,27	1,34	1,54	0,117	0,087	12,1	7,98
4	0,709	0,835	1,29	1,29	1,36	1,58	0,151	0,113	14,2	9,64
5	0,656	0,778	1,27	1,16	1,27	1,48	0,144	0,123	12,1	7,91
6	0,678	0,798	1,30	1,30	1,30	1,52	0,200	0,145	14,6	9,56
7	0,706	0,821	1,30	1,29	1,35	1,56	0,170	0,110	15,4	9,96
8	0,711	0,841	1,29	1,29	1,36	1,59	0,124	0,090	13,1	8,79

Fonte: o próprio autor.

$$\text{Efeito Cc} = (s + u + w + y/4) - (t + v + x + z/4)$$

Equação 5

Tabela 17 - Efeitos dos parâmetros analíticos para área, t_r , concentração, simetria e resolução para avaliação da robustez do método para ácido fórmico.

Efeito/Fórmula	Área (razão PI)	t_r (razão PI)	Concentração (mmol L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão (A = 30 kV; a = 25 kV)	0,050 - 0,070 = -0,020	0,729 - 0,725 = 0,004	0,160 - 0,219 = -0,059	1,086 - 1,332 = -0,446	16,096 - 14,262 = 1,834
pH (A = 3,63; a = 3,73)	0,050 - 0,070 = -0,021	0,726 - 0,728 = 0,001	0,139 - 0,219 = -0,059	0,948 - 1,670 = -0,722	13,883 - 16,472 = -2,587
Temperatura (A = 25°C; a = 20°C)	0,051 - 0,069 = -0,018	0,736 - 0,718 = 0,018	0,163 - 0,215 = -0,052	1,119 - 1,498 = -0,379	14,416 - 15,941 = -1,524
Pressão (A = 50 mbar; a = 55 mbar)	0,070 - 0,050 = 0,020	0,726 - 0,728 = -0,002	0,218 - 0,160 = 0,038	1,544 - 1,074 = 0,469	14,623 - 15,734 = -1,111
Comprimento de onda (A = 254 nm; a = 258 nm)	0,051 - 0,069 = -0,018	0,736 - 0,718 = 0,018	0,163 - 0,215 = -0,052	1,119 - 1,498 = -0,379	14,416 - 15,941 = -1,524
Tempo de lavagem (A = 60 s; a = 30 s)	0,068 - 0,052 = 0,016	0,729 - 0,725 = 0,004	0,212 - 0,166 = 0,047	1,438 - 1,180 = 0,257	15,053 - 15,303 = -0,248
Tempo de injeção (A = 3 s; a = 4 s)	0,052 - 0,068 = -0,017	0,719 - 0,734 = -0,015	0,165 - 0,213 = -0,048	1,106 - 1,511 = -0,405	15,792 - 14,561 = 1,235

Observando as variações quanto aos efeitos dos parâmetros alterados para o ácido fórmico, pôde-se verificar valores medianos de variações para o fator resposta área padrão/PI; e valores baixos para o restante dos fatores resposta. Observou-se variações similares quanto aos fatores resposta área e concentração, apresentando maior efeito no fator resposta t_m os parâmetros temperatura, comprimento de onda e tempo de injeção; no fator resposta simetria o parâmetro pH e no fator resposta resolução o parâmetro pH, evidenciando apesar de pequeno, o efeito destes parâmetros na separação.

Tabella 18: Efeitos dos parâmetros analíticos para área, t_w , concentração, simetria e resolução para avaliação da robustez do método para ácido láctico.

Efeito Láctico	Área (razão PI)	t_w (razão PI)	Concentração (mmol L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão (A = 30 kV; a = 25 kV)	0,080 - 0,079 = 0,001	0,943 - 0,942 = 0,001	0,185 - 0,182 = -0,002	0,285 - 0,315 = -0,030	3,440 - 3,522 = -0,082
pH (A = 3,63; a = 3,73)	0,080 - 0,079 = 0,001	0,943 - 0,942 = 0,001	0,184 - 0,183 = 0,002	0,309 - 0,291 = 0,018	3,384 - 3,578 = -0,194
Temperatura (A = 25°C; a = 20°C)	0,079 - 0,079 = 0,000	0,947 - 0,939 = 0,008	0,184 - 0,183 = 0,001	0,300 - 0,299 = 0,001	3,219 - 3,743 = -0,525
Pressão (A = 50 mbar; a = 55 mbar)	0,079 - 0,079 = 0,000	0,942 - 0,943 = -0,001	0,183 - 0,184 = -0,001	0,296 - 0,303 = -0,007	3,561 - 3,401 = 0,159
Comprimento de onda (A = 254 nm; a = 258 nm)	0,079 - 0,079 = 0,000	0,947 - 0,939 = 0,008	0,184 - 0,183 = 0,001	0,300 - 0,299 = 0,001	3,219 - 3,743 = -0,525
Tempo de lavagem (A = 60 s; a = 30 s)	0,079 - 0,080 = -0,001	0,943 - 0,942 = 0,001	0,183 - 0,184 = -0,001	0,303 - 0,297 = 0,006	3,482 - 3,480 = 0,002
Tempo de injeção (A = 3 s; a = 4 s)	0,079 - 0,079 = 0,000	0,940 - 0,945 = -0,005	0,183 - 0,184 = -0,001	0,313 - 0,287 = 0,026	3,788 - 3,174 = 0,614

Observando as variações quanto aos efeitos dos parâmetros alterados para o ácido láctico, puderam-se verificar valores baixos de uma forma geral para as variações dos fatores resposta, destacando variações similares para as variações dos fatores resposta área padrão/PI e concentração quanto aos parâmetros analisados, tendo maior efeito no fator resposta t_m os parâmetros temperatura e comprimento de onda, no fator resposta simetria os parâmetros tensão e tempo de injeção e no fator resposta resolução os parâmetros tempos de injeção e comprimento de onda.

Tabela 19: Efeitos dos parâmetros analíticos para área, t_m , concentração, simetria e resolução para avaliação da robustez do método para ácido acético.

Efeito/ Acético	Área (razão PI)	t_m (razão PI)	Concentração (mmol L ⁻¹)	Simetria	Resolução
Tensão (A = 30 kV; a = 25 kV)	0,798 - 0,810 = -0,011	1,276 - 1,258 = 0,018	1,518 - 1,538 = -0,020	0,110 - 0,117 = -0,007	8,980 - 9,056 = -0,077
pH (A = 3,63; a = 3,73)	0,780 - 0,827 = -0,047	1,251 - 1,283 = -0,032	1,486 - 1,569 = -0,083	0,127 - 0,100 = 0,027	8,943 - 9,093 = -0,150
Temperatura (A = 25°C; a = 20°C)	0,797 - 0,810 = -0,013	1,249 - 1,285 = -0,037	1,516 - 1,539 = -0,023	0,111 - 0,116 = -0,005	8,892 - 9,144 = -0,252
Pressão (A = 50 mbar; a = 55 mbar)	0,802 - 0,806 = -0,004	1,280 - 1,254 = 0,026	1,524 - 1,531 = -0,007	0,110 - 0,117 = -0,007	9,263 - 8,773 = 0,489
Comprimento de onda (A = 254 nm; a = 258 nm)	0,797 - 0,810 = -0,013	1,249 - 1,285 = -0,037	1,516 - 1,539 = -0,023	0,111 - 0,116 = -0,005	8,892 - 9,144 = -0,252
Tempo de lavagem (A = 60 s; a = 30 s)	0,808 - 0,800 = 0,008	1,253 - 1,281 = -0,029	1,535 - 1,520 = 0,015	0,113 - 0,115 = -0,002	9,014 - 9,022 = -0,009
Tempo de injeção (A = 3 s; a = 4 s)	0,808 - 0,800 = 0,008	1,287 - 1,247 = 0,040	1,535 - 1,521 = 0,014	0,123 - 0,104 = 0,019	9,718 - 8,318 = 1,400

Observando as variações quanto aos efeitos dos parâmetros alterados para o ácido acético, puderam-se verificar valores baixos de uma forma geral para as variações dos fatores resposta, com exceção do efeito da condição tempo de injeção no fator resposta resolução. Destaca-se variações similares do fator resposta t_m , tendo maior efeito no fator resposta de área padrão/PI o parâmetro pH, no fator resposta concentração o parâmetro pH, no fator resposta simetria o parâmetro pH e no fator resposta resolução o parâmetro tempo de injeção, evidenciando apesar de pequeno, o efeito destes parâmetros.

A partir do teste de *Youden* foi possível avaliar a robustez do método proposto frente a variações de sete parâmetros analíticos em apenas oito análises, concluindo-se que o método é robusto para as variações testadas, com exceção da condição pH que promove comigração entre os ácidos fórmico e láctico, quando na presença destes compostos, onde os efeitos resultaram em valores discrepantes. Esse fato pode ser minimizado pelo fato de o eletrólito de corrida ser preparado com reagentes na forma sólida, sem a necessidade de ajuste do pH em pHmetro, o que aumentaria essa interferência.

3.7 QUANTIFICAÇÃO EM AMOSTRAS

ACAIBPM foram determinados em doze amostras de cachaças a fim de demonstrar a aplicabilidade do método proposto no parâmetro acidez pela metodologia proposta por CE e comparação pela determinação de acidez titulável total (ATT) por titulometria, uma vez que esta é a metodologia recomendada pelo MAPA para determinação do parâmetro de acidez. Os valores médios encontrados para as análises realizadas em triplicata estão apresentados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20: Resultados de concentração individual (mg L^{-1}) de ácidos fórmico, láctico e acético em amostras de cachaça.

Amostras	Fórmico ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$)	Láctico ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$)	Acético ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$)	Total ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$)
1-2NE	0,45 ± 0,001	2,10 ± 0,04	11,5 ± 0,12	14,0 ± 0,10
1-3NE	0,19 ± 0,02	1,02 ± 0,25	5,39 ± 0,26	6,60 ± 0,07
1-E3A	0,68 ± 0,02	2,53 ± 0,03	9,89 ± 0,55	13,1 ± 0,54
1-E4A	0,59 ± 0,04	2,83 ± 0,55	9,38 ± 0,16	12,8 ± 0,53
1-E6A	0,74 ± 0,01	4,41 ± 0,49	11,0 ± 0,38	16,1 ± 0,40
1-E12A	0,88 ± 0,07	6,41 ± 1,01	12,4 ± 0,62	19,6 ± 1,07
1-E16A	1,16 ± 0,01	8,51 ± 1,09	14,1 ± 0,48	23,8 ± 1,45
2-E3A	1,07 ± 0,06	3,65 ± 1,34	30,3 ± 1,09	35,4 ± 2,10
2-E5A	1,49 ± 0,05	2,82 ± 0,28	30,5 ± 1,69	34,8 ± 1,44
3-E3A	2,87 ± 0,13	7,88 ± 0,48	50,0 ± 1,12	60,8 ± 0,65
3-E2A1	2,99 ± 0,15	16,5 ± 1,04	67,3 ± 2,98	86,8 ± 0,56
3-E2A2	1,90 ± 0,07	10,3 ± 0,45	106,4 ± 4,55	118,6 ± 1,81

Legenda: identificação das amostras encontra-se em material e métodos, item 2.5.10: preparo de amostras.

Fonte: o próprio autor.

Apartir dos dados da Tabela 20, pode-se verificar o aumento no valor de acidez a partir do valor total obtido do somatório das concentrações encontradas para os ácidos fórmico, láctico e acético, para amostras com maior tempo de envelhecimento (1-E12A e 1-E16A). A identificação individual das concentrações destes ácidos permite identificar o grau de participação destes no valor da acidez total destas amostras e, conseqüentemente, a identificação do tipo de fermentação ocorrida no processo de fermentação, além da fermentação alcoólica, podendo-se sugerir a ocorrência de fermentações secundárias como láctica e acética durante o processo fermentativo alcoólico, caracterizadas pela presença dos ácidos láctico e acético.

Tabela 21: Resultados de acidez encontrados pelas metodologias CE e titulometria em amostras de cachaça.

Totalácidos EC (mg 100 mL ⁻¹)	ATT (mg 100 mL ⁻¹)
14,0 ± 0,10	20,7 ± 0,34
6,60 ± 0,07	9,41 ± 0,00
13,1 ± 0,54	17,8 ± 0,34
12,8 ± 0,53	19,8 ± 2,22
16,1 ± 0,40	18,4 ± 0,68
19,6 ± 1,07	21,4 ± 0,68
23,8 ± 1,45	24,1 ± 0,59
35,4 ± 2,10	44,3 ± 0,90
34,8 ± 1,44	53,3 ± 0,90
60,8 ± 0,65	76,4 ± 1,04
86,8 ± 0,56	92,9 ± 1,88
118,6 ± 1,81	137,1 ± 5,14

Legenda: ATT (acidez total titulável).

Fonte: o próprio autor.

O teste *t* pareado bicaudal foi utilizado para testar a hipótese nula de igualdade entre as médias apresentadas na Tabela 21, resultando em um $p = 0.001$ ($p < 0,05$), logo, evidenciando diferença significativa entre as médias dos resultados para um $\alpha = 0,05$ e rejeitando-se a hipótese de igualdade entre estas médias.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A validação intralaboratorial foi realizada para verificação dos parâmetros: linearidade e faixa de trabalho, efeito de matriz, seletividade, repetibilidade, reprodutibilidade parcial, recuperação, limites de detecção e quantificação e robustez. O método se mostrou linear por avaliação visual e R^2 na faixa de 6,97 a 27,8, 6,24 a 24,9; 9,01 a 36,0; 2,76 a 11,04; 11,5 a 46,1; 8,05 a 32,1; 4,57 a 18,2; 8,11 a 32,4; 7,09 a 28,3; 36 a 144 mg L⁻¹ para os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, succínico e acético, respectivamente, porém, se forem avaliadas premissas de ajuste ao método MMQO como normalidade, homoscedasticidade e independência de resíduos, atendem às premissas para curva de calibração aquosa, apenas os ácidos cítrico, glicólico, lático e succínico e para curva de calibração em matriz, apenas lático e acético, sendo portanto necessária uma avaliação criteriosa no que diz respeito a escolha de modelos de ajuste para regressão linear para determinação de vários compostos, podendo-se sugerir ponderações à regressão. Os limites de detecção variaram de 0,69 a 5,76 mg L⁻¹ com DPR de 4,9 a 9,4%; os limites de quantificação variaram de 2,76 a 11,5 mg L⁻¹ com DPR de 3,8 a 8,6%; o método mostrou-se robusto para os parâmetros tensão, temperatura, pressão, comprimento de onda, tempo de lavagem e tempo de injeção; a recuperação foi avaliada em sete níveis para estes ácidos: maleico (99,4 a 109,3%), malônico (100,2 a 110,7%), tartárico (103,3 a 111,7%), fórmico (103,3 a 117,9%), cítrico (93,7 a 107,4%), málico (104,1 a 130,5%), glicólico (118,4 a 126,0%), lático (105,5 a 145,5%), succínico (99,2 a 112,3%) e acético (89,6 a 104,6%). Os valores de DPR para reprodutibilidade parcial e repetibilidade foram satisfatórios, menores que 9,81 e 12,9%, respectivamente. A metodologia foi aplicada na análise de 2 amostras de cachaça não envelhecidas e 10 amostras envelhecidas com preparo de amostra por simples diluição. A concentrações encontradas variaram de 0,19 a 2,99 mg L⁻¹ para o ácido fórmico; 1,02 a 16,5 mg L⁻¹ para o ácido lático; e 5,39 a 106,4 mg L⁻¹ para ácido acético. A acidez titulável total também foi avaliada pelo método oficial titulométrico e as concentrações encontradas apresentaram diferença significativa, em um nível de significância de 5%, em relação às concentrações obtidas por CE, indicando a potencialidade da técnica para discriminação individual destes ácidos presentes em amostras de cachaça e sua importância no controle de qualidade da bebida, uma vez que estes ácidos, como lático e

acético, podem fornecer informações sobre controles de processo e higiene que venham a afetar a qualidade e rendimento do álcool produzido. Ainda são necessários estudos que comprovem ou não a interferência de impurezas advindas do padrão analítico de ácido láctico nos valores de recuperação.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução N. 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, abr./jun., 2009.

EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. **Teddington: LGC**, 1998.

FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389-396, 2008.

GAS, B.; JAROS, M.; HRUSKA, V.; ZUSKOVA, I.; STEDRÝ, M. PeakMaster – A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. **LC•GC Europe**, v. 18, p. 282-288, 2005.

INMETRO (Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, Rev. 3, Fev. 2010.

OIV (Compendium of International Analysis of Methods). Guide for the validation – quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method. OIV – MA-AS1-12: R2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, vl. 27, Nº 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. R.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova

ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SOUZA, S, V, C, Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos, 2007, **Tese Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte – MG.

SOUZA, S, V, C,; JUNQUEIRA, R, G, A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou a potencialidade da eletroforese capilar aplicada à análise de ânions alifáticos de baixa massa molecular com o uso de capilares revestidos com QTS quaternizada. O preenchimento do capilar com este polímero apresentou-se como uma alternativa ao uso de CTAB para inversão do fluxo eletrosmótico. A otimização da separação permitiu o uso de ferramentas de simulação com sucesso, resultando em análises com tempos relativamente curtos; redução no número de experimentos e, conseqüentemente, dos custos envolvidos com reagentes e padrões. Com o auxílio do simulador SIMULSC foi possível a construção de curvas de mobilidade para auxiliar na escolha do pH do eletrólito de corrida e o *software* PeakMaster®, permitiu a simulação dos eletroferogramas com resultados próximos a realidade experimental. O método proposto tem potencialidade para ser aplicado na determinação de ACAIBPM em bebidas destiladas, uma vez que esses analitos são comumente encontrados nessas amostras. A validação intralaboratorial foi realizada para verificação dos parâmetros: linearidade e faixa de trabalho, efeito de matriz, seletividade, repetibilidade, reprodutibilidade parcial, recuperação, limites de detecção e quantificação e robustez. O método se mostrou linear por avaliação visual e R^2 na faixa de 6,97 a 27,8, 6,24 a 24,9; 9,01 a 36,0; 2,76 a 11,04; 11,5 a 46,1; 8,05 a 32,1; 4,57 a 18,2; 8,11 a 32,4; 7,09 a 28,3; 36 a 144 mg L⁻¹ para os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, succínico e acético, respectivamente, porém, se forem avaliadas premissas de ajuste ao método MMQO como normalidade, homoscedasticidade e independência de resíduos, atendem às premissas para curva de calibração aquosa, apenas os ácidos cítrico, glicólico, láctico e succínico e para curva de calibração em matriz, apenas láctico e acético. Os limites de detecção variaram de 0,69 a 5,76 mg L⁻¹ com DPR de 4,9 a 9,4%; os limites de quantificação variaram de 2,76 a 11,5 mg L⁻¹ com DPR de 3,8 a 8,6%; o método mostrou-se robusto para os parâmetros tensão, temperatura, pressão, comprimento de onda, tempo de lavagem e tempo de injeção; a recuperação foi avaliada em sete níveis para estes ácidos: maleico (99,4 a 109,3%), malônico (100,2 a 110,7%), tartárico (103,3 a 111,7%), fórmico (103,3 a 117,9%), cítrico (93,7 a 107,4%), málico (104,1 a 130,5%), glicólico (118,4 a 126,0%), láctico (105,5 a 145,5%), succínico (99,2 a 112,3%) e acético (89,6 a 104,6%). Os valores de DPR para reprodutibilidade parcial e repetibilidade foram satisfatórios,

menores que 9,81 e 12,9%, respectivamente. A metodologia foi aplicada na análise de 2 amostras de cachaça não envelhecidas e 10 envelhecidas com preparo de amostra por simples diluição. As concentrações encontradas variaram de 0,19 a 2,99 mg L⁻¹ para o ácido fórmico; 1,02 a 16,5 mg L⁻¹ para o ácido láctico; e 5,39 a 106,4 mgL⁻¹ para ácido acético. A acidez titulável total também foi avaliada pelo método titulométrico e as concentrações encontradas apresentaram diferença significativa, em um nível de significância de 5%, em relação às concentrações obtidas por CE, indicando potencialidade da técnica para discriminação individual destes ácidos presentes em amostras de cachaça e sua importância no controle de qualidade da bebida, uma vez que estes ácidos, como láctico e acético, podem fornecer informações sobre controles de processo e higiene que venham a afetar a qualidade e rendimento do álcool produzido.

Ainda se faz necessário a realização de estudos aprofundados sobre a influência das impurezas oriundas do padrão ácido láctico, quais os efeitos nos valores de recuperação e quais medidas devem ser tomadas para minimizar esses efeitos.

Para a aplicação desse método analítico na análise de ACAIBPM em outras bebidas, é imprescindível que se faça um estudo de efeito de matriz e robustez para os outros ácidos a serem estudados.