

PATRICIA BRUGNEROTTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÊIS DE MELATO DE
BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.) E FLORAIS DO ESTADO DE
SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

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

**FLORIANÓPOLIS
2018**

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

Brugnerotto, Patricia
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÉIS DE MELATO DE
BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.) E FLORAIS DO
ESTADO DE SANTA CATARINA / Patricia Brugnerotto ;
orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa, 2018.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ácidos orgânicos
alifáticos. 3. *Apis mellifera*. 4. Validação
analítica. 5. Eletroforese capilar. I. Costa, Ana
Carolina de Oliveira. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. III. Título.

Patricia Brugnerotto

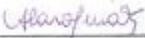
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE
ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÊIS DE MELATO DE
BRACATINGA (*Mimosa scabrella Bentham*) E FLORAIS DO
ESTADO DE SANTA CATARINA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
"Mestrado em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018

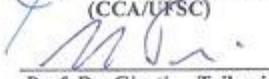

Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina de Oliveira Costa,
Orientadora (CCA/UFSC)


Dr. Heitor Daguer,
(MAPA)


Prof.(a). Dr.(a). Carmen Maria Olivera Müller,
(CCA/UFSC)


Prof. Dr. Glustino Tribuzi,
(CCA/UFSC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar-me em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Aldecir e Nilva, minha eterna gratidão por nunca medirem esforços em ajudar-me e apoiar-me em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão Rodrigo, cunhada Lenita e sobrinhos amados, Leonardo e Gabriel pelo apoio e carinho sempre.

Ao meu namorado Bernardo, pelo incentivo, pela imensa compreensão e paciência, pelas palavras de conforto e por todos os momentos que passou ao meu lado.

A professora e orientadora Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, pela oportunidade em realizar o mestrado, confiança, ensinamentos, enfim, todas as contribuições foram indispensáveis para o enriquecimento e finalização desse trabalho, muito obrigada !!!

Aos atuais membros do Laboratório de Química de Alimentos: Prof.^a Dra. Roseane Fett, Luciano Gonzaga, Greice Bergamo, Francieli Braghini, Bruno Ferreira, Fabíola Biluca e Bibiana da Silva, por todos os momentos de descontração e aprendizados. Em especial, agradeço a Siluana Seraglio, pela dedicação e paciência, que por inúmeras vezes me auxiliou e contribuiu para a realização desse trabalho. Agradecimento especial também à Mayara Schulz por todas as contribuições e conselhos dados a mim durante essa caminhada.

À Fabiana Della Betta, por todo o conhecimento e experiência em validação e eletroforese capilar, pelas infinitas contribuições e ensinamentos dados durante sua jornada no LabQA e que continuam até hoje! Obrigada!!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelos novos conhecimentos adquiridos, pela infra-estrutura e tornar possível a execução do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca, Prof.^a Dra. Carmen Müller, Prof. Dr. Giustino Tribuzi e Dr. Heitor Daguer, pelo aceite em participar da defesa de dissertação e pelas contribuições para a finalização desse trabalho.

Enfim..meu sincero agradecimento a todos que contribuíram para a realização e finalização de mais uma etapa de minha vida !!!

RESUMO

Os ácidos orgânicos alifáticos (AOA), mesmo sendo compostos minoritários nos méis, apresentam importantes contribuições para o sabor, aroma, acidez, pH e condutividade elétrica. Nesse contexto, o trabalho proposto contempla o desenvolvimento e validação de um método para determinação de 14 AOA por eletroforese capilar de zona e aplicação do método em amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e florais do estado de Santa Catarina. Os AOA foram separados em tempo inferior a 10 minutos, com padrão interno ácido glioxílico. O eletrólito de corrida foi composto por: ácido ftálico 20 mmol L⁻¹, tris(hidroximetil)aminometano 14 mmol L⁻¹, brometo de cetiltrimetil amônio 1,6 mmol L⁻¹ e cloreto de cálcio 1 mmol L⁻¹, pH 3,3. Foi utilizado um capilar de sílica fundida com 60,5 cm (comprimento total), 52 cm (comprimento efetivo), 75 µm (diâmetro interno), tensão de 15 kV, polaridade negativa, injeção hidrodinâmica (50 mbar/3 s) e detecção indireta em 230 nm. A conformidade do sistema apresentou valores de coeficiente de variação (CV %) inferiores a 0,15 % e 2,65 % para o tempo de migração e área corrigidos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) avaliados em solução aquosa variaram de 0,07 a 0,72 mg L⁻¹ e 0,25 a 2,42 mg L⁻¹, respectivamente. Na solução em matriz os LOD e LOQ variaram de 0,30 a 1,30 mg L⁻¹ e 0,77 a 4,34 mg L⁻¹, respectivamente. A precisão intra-ensaio e inter-ensaio apresentaram valores inferiores a 5% e 8%, para a área e tempo de migração corrigidos, respectivamente. A recuperação apresentou resultados satisfatórios para todos os AOA avaliados, variando de 81,13 a 106,26 % para mel floral e 80,55 a 106,93 % para mel de melato de bracatinga. A faixa de concentração dos AOA variou de 9,09 a 8.711,98 mg 100 g⁻¹ em méis florais e de 39,79 a 7.415,58 mg 100 g⁻¹ em méis de melato de bracatinga. Devido aos baixos LOD e LOQ e satisfatório desempenho analítico, o método proposto pode ser aplicado na avaliação da qualidade de méis, uma vez que, os AOA podem ser utilizados como indicadores de qualidade e deterioração e também, fornecem importantes contribuições para as propriedades físico-químicas e sensoriais dos méis.

Palavras Chaves: Ácidos orgânicos alifáticos. *Apis mellifera*. Eletroforese capilar. Validação analítica.

ABSTRACT

The aliphatic organic acids (AOA), which are minority compounds in honeys, are important because of its contribution to flavor, acidity, pH and electrical conductivity. The proposed work consists in the development and validation of a method for determination of 14 AOA using capillary zone electrophoresis. This method was applied on samples of bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) honeydew and floral honeys with samples from the state of Santa Catarina. The AOA were separated in less than 10 minutes, using glyoxylic acid as internal standard. The background electrolyte was composed of: phthalic acid 20 mmol L⁻¹, tris(hydroxymethyl)aminomethane 14 mmol L⁻¹, cetyltrimethylammonium bromide 1.6 mmol L⁻¹ and calcium chloride 1 mmol L⁻¹, pH 3.3. The experimental conditions used were: capillary 60.5 cm (total length), 52 cm (effective length), 75 µm (inner diameter), voltage of -15 kV, hydrodynamic injection (50 mbar/3 s) and indirect detection in 230 nm. The system suitability presented coefficient of variation (CV %) lower than 0.15% and 2.65% for the migration time and corrected area. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were measured in aqueous and matrix solutions. For aqueous solution the LOD ranged from 0.07 to 0.72 mg L⁻¹ and the LOQ ranged from 0.25 to 2.42 mg L⁻¹, respectively. For matrix solution LOD and LOQ ranged from 0.30 to 1.30 mg L⁻¹ and the 0.77 to 4.34 mg L⁻¹, respectively. The repeatability intra-assay and inter-assay presented values below 5% for corrected area and 8% for corrected migration time. Recovery presented satisfactory results for all AOA evaluated, ranging from the 81.13 to 106.26 % in floral honey and 80.55 to 106.93 % in bracinga honeydew honey. The concentration range for the remaining AOA on samples of floral honeys ranged from 9.09 to 8711.98 mg 100 g⁻¹. In honeydew honeys of bracinga the range of concentration varied from 39.79 to 7415.58 mg 100 g⁻¹ for the maleic and gluconic acids, respectively. Due to the low LOD and LOQ and satisfactory analytical performance, the proposed method can be applied in the evaluation of honey quality, since AOA can be used as indicators of quality and deterioration and also provide important contributions to the physical- chemical and sensory properties of honeys.

Keywords: Aliphatic organic acids. *Apis mellifera*. Capillary electrophoresis. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação estrutural de ácidos orgânicos alifáticos normalmente encontrados em méis de diferentes regiões geográficas..	25
Figura 2- Oxidação da D-glicose a ácido glucônico catalisada pela enzima glicose-oxidase.	26
Figura 3 – Racionalização de etapas seguidas durante o desenvolvimento de método por eletroforese capilar.....	36
Figura 4- Representação esquemática para verificar qual teste <i>t-Student</i> utilizar a partir da aplicação do teste F, a fim de avaliar o efeito de matriz.....	50
Figura 5- Curva de mobilidade efetiva dos ácidos orgânicos alifáticos <i>versus</i> pH para avaliação da escolha do pH do eletrólito de corrida.	55
Figura 6- Curva contruída utilizando o Peakmaster [®] para otimização do BGE. (A) Parâmetros do BGE <i>versus</i> concentração de TRIS e (B) EMD <i>versus</i> concentração de TRIS.	57
Figura 7 – Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da simulação no Peakmaster [®]	59
Figura 8 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da CZE.....	60
Figura 9- Gráficos dos resíduos da regressão linear para os ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.	62
Figura 10- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva de matriz de mel floral.	66
Figura 11- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva da matriz de mel de melato.....	68
Figura 12 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da eletroforese capilar de zona para avaliação da seletividade do método.....	73
Figura 13 - Influência dos parâmetros analíticos sob a área corrigida dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.....	81
Figura 14 - Influência dos parâmetros analíticos sob o tempo de migração corrigido dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.....	82
Figura 15- Influência dos parâmetros analíticos sob a concentração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.....	83
Figura 16- Influência dos parâmetros analíticos sob a simetria dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.....	84

Figura 17 – Influência dos parâmetros analíticos sob a simetria dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.	85
Figura 18 – Eletroferograma da separação dos AOA em mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Benth.) da cidade de Urubici.	88
Figura 19 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos em mel floral da cidade de Lages.	93
Figura 20- Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.	121
Figura 21- Representação esquemática dos modos de separação em CE. (A) contra-eletrosmótico e (B) co-eletrosmótico.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros utilizados para diferenciar as classes de mel floral e mel de melato.	23
Tabela 2- Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes classes de méis e regiões.	31
Tabela 3 - Concentrações dos ácidos orgânicos alifáticos em cada nível da curva de calibração.	44
Tabela 4- Informações das amostras de mel floral e de melato de bracinga (<i>Mimosa scabrella</i> Benth.) utilizadas no preparo das misturas.	45
Tabela 5- Estruturas químicas, valores de pK_a e mobilidades eletroforéticas dos ácidos orgânicos alifáticos.	47
Tabela 6 – Concentração dos ácidos orgânicos alifáticos e dos interferentes utilizados para verificação da seletividade do método.	51
Tabela 7 - Parâmetros analíticos e condições nominais e alteradas.	53
Tabela 8- Delineamento experimental aplicado no teste de Youden. ...	53
Tabela 9- Resultados do teste de conformidade do sistema para aos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.	61
Tabela 10- Resultados do teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.	63
Tabela 11- Resultados do teste de <i>Cochran</i> para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.	64
Tabela 12- Resultados de teste de <i>Durbin-Watson</i> para avaliação da independência dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.	65
Tabela 13- Resultados do teste <i>F</i> para avaliação do ajuste ao modelo linear dos ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.	65
Tabela 14- Resultados do teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracinga.	69
Tabela 15- Resultados do teste de <i>Cochran</i> para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracinga.	70
Tabela 16- Resultados de teste de <i>Durbin-Watson</i> para avaliação da independência dos resíduos da regressão da curva de calibração dos	

ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracatinga.	71
Tabela 17- Resultados do teste <i>F</i> para avaliação do ajuste ao modelo linear dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracatinga.	72
Tabela 18- Verificação do efeito de matriz através do teste de <i>t-Student</i>	72
Tabela 19- Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os AOA expressos em CV %.	74
Tabela 20- Média da recuperação para os AOA em amostra de mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) e floral em três níveis de concentração.	76
Tabela 21 - Valores recomendados aceitáveis e resultados de recuperação obtidos para os ácidos orgânicos alifáticos expressos em faixas de concentração.	78
Tabela 22- Limite de detecção e quantificação avaliados em solução aquosa e matriz para os ácidos orgânicos alifáticos.	78
Tabela 23- Ácidos orgânicos alifáticos (mg 100 g ⁻¹) presentes em méis de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) do estado de Santa Catarina.	89
Tabela 24- Ácidos orgânicos alifáticos (mg 100 g ⁻¹) presentes em méis florais do estado de Santa Catarina.	94

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

AOA	Ácido Orgânico Alifático
AOAC	Association of Analytical Communities
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE	Eletrolito de Corrida (do inglês, <i>Background Electrolyte</i>)
CE	Eletroforese Capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CIRAM	Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina
GC-MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry</i>)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>) (mmol L^{-1})
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
CV	Coefficiente de Variação (%)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (do inglês, <i>Diode-Array Detector</i>)
EOF	Fluxo Eletrosmótico (do inglês, <i>Electroosmotic Flow</i>)
EMD	Dispersão por Eletromigração (do inglês, <i>Electromigration Dispersion</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
I.S.	Padrão Interno (do inglês, <i>Internal Standard</i>) (mg L^{-1})
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>) (mg L^{-1})
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantification</i>) (mg L^{-1})
L_{eff}	Comprimento Efetivo (do inglês, <i>Effective Length</i>) (cm)
L_{tot}	Comprimento total (do inglês, <i>Total Length</i>) (cm)
UV-Vis	Ultravioleta/Visível (do inglês, <i>Ultraviolet-Visible</i>)
μ_{eff}	Mobilidade Efetiva (do inglês, <i>Effective Mobility</i>) ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
μ_{el}	Mobilidade Eletroforética (do inglês, <i>Electrophoretic</i>)

TRIS *Mobility* ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Tris-(hidroximetil)-aminometano (do inglês,
Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 MEL: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E QUALIDADE.....	21
2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÉIS	24
2.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÉIS	29
2.4 RACIONALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR.....	35
2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM CZE UTILIZANDO SIMULAÇÃO	37
2.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	38
2.6.1 Conformidade do sistema.....	38
2.6.2 Faixa de trabalho e linearidade.....	39
2.6.3 Efeito de matriz	40
2.6.4 Seletividade	40
2.6.5 Precisão	41
2.6.6 Exatidão.....	41
2.6.7 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	42
2.6.8 Robustez.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Padrões analíticos e reagentes	43
3.2 Preparo das soluções	43
3.3 Amostras	44
3.4 Preparo de amostras	45
3.5 Instrumentação e condições analíticas	46
3.6 Análise estatística	47
3.7 Desenvolvimento do método por eletroforese capilar.....	47
3.8 Validação analítica intralaboratorial	49
3.8.1 Conformidade do sistema.....	49
3.8.2 Linearidade.....	49
3.8.3 Efeito de matriz	50
3.8.4 Seletividade	51
3.8.5 Precisão	51
3.8.6 Exatidão.....	52

3.8.7 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	52
3.8.8 Robustez.....	52
4 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Desenvolvimento do método por eletroforese capilar.....	55
5.2 Conformidade do Sistema.....	60
5.3 Linearidade	61
5.4 Efeito de matriz.....	66
5.5 Seletividade.....	73
5.6 Precisão.....	74
5.7 Exatidão	76
5.8 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	78
5.9 Robustez.....	80
6 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Benth.).....	88
7 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM MEL FLORAL	93
8 MEL DE MELATO DE BRACATINGA <i>versus</i> MEL FLORAL: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS	97
9 INFLUÊNCIA DO PERÍODO DE COLHEITA E CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS NA CONCENTRAÇÃO DOS AOA EM MÉIS DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Benth.) e FLORAL.....	100
10 CONCLUSÕES	103
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
11 REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICE.....	119

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os estados pertencentes a região sul do Brasil, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul apresentam singulares características climáticas, florais, espécies florestais nativas como a bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e de abelhas do gênero *Apis*. Essas características conferem ao Brasil um inigualável potencial para atividade apícola. Tal diversidade diferencia o Brasil de outros países produtores de méis, possibilitando colheitas durante o ano todo, além de causar impactos econômicos e sociais, contribuindo para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes (MANTILLA et al., 2012; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; MENDES; MESQUITA, 2009; MENDONÇA, 2008).

A classificação do mel está relacionada com a origem da matéria-prima utilizada pelas abelhas na sua elaboração. Quando a matéria-prima é proveniente do néctar ou pólen das flores, denomina-se “mel floral” e quando a matéria-prima é proveniente de secreções de plantas ou excreções de insetos sugadores, denomina-se “mel de melato”. (MARENDA et al., 2011; SILVA; SILVA; NETTO, 2011). Além da produção de méis florais, no estado de Santa Catarina, em meses de escassez de néctar e pólen, geralmente de março a maio e em períodos bianuais (ciclo da cochonilha), ocorre o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) produzido pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de excreções do inseto sugador (SAKR; DALLABRIDA, 2015; SILVA; SILVA; NETTO, 2011).

O mel está entre os alimentos mais complexos produzidos pela natureza e sua composição, propriedades físico-químicas e sensoriais dependem, da fonte floral e/ou de plantas, espécies de abelhas, região geográfica, estação climática e método de armazenamento (BILANDŽIĆ et al., 2017). Constituído por aproximadamente 200 substâncias, os monossacarídeos frutose e glicose, além da água, compõem a porção majoritária dos méis (GALLINA; STOCCO; MUTINELLI, 2010; MANZANARES et al., 2011). Além de outros compostos minoritários, entre eles, compostos fenólicos (CAN et al., 2015; SERAGLIO et al., 2016), aminoácidos (AZEVEDO et al., 2017; DEL CAMPO et al., 2016), minerais (BILANDZIC et al., 2017), vitaminas (KAYGUSUZ et al., 2016; LEÓN-RUIZ et al., 2011), proteínas (AZEVEDO et al., 2017) e ácidos orgânicos (HAROUN et al., 2012; MATO et al., 2006a).

Os AOA, apesar de serem compostos minoritários nos méis, podem ser utilizados como indicadores de qualidade e deterioração e sua determinação fornece contribuições importantes para as propriedades físico-químicas como a acidez, pH e condutividade elétrica, além das propriedades sensoriais como o aroma e sabor (TEZCAN et al., 2011).

A CE é uma técnica de separação pouco empregada na determinação de AOA em méis porém, apresenta inúmeras vantagens em comparação a outras técnicas analíticas. Entre as vantagens, a CE destaca-se pelo baixo impacto ambiental devido ao baixo consumo de reagentes e amostra e conseqüentemente, minimização na geração de resíduos químicos, além de rapidez nas separações e alto poder de resolução (DA SILVA et al., 2007).

Para assegurar que a qualidade dos resultados analíticos obtidos, principalmente em análise de alimentos, sejam confiáveis e impossibilitem interpretações e decisões com base em resultados incorretos, é fundamental que o desenvolvimento ou modificações de métodos, seja acompanhado de um procedimento de validação (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007).

Nesse contexto, observa-se a necessidade de desenvolver e validar um novo método analítico a fim de ampliar o conhecimento a respeito de AOA presentes em mel floral e mel de melato, visto que, esses compostos são pouco explorados nessas matrizes. Até o momento os AOA não foram investigados em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e florais do estado de Santa Catarina.

O ineditismo do tema proposto é reconhecido por meio do desenvolvimento, validação e, principalmente, aplicação do método em méis de melato de bracatinga e florais oriundos de São Joaquim, Bom Retiro, Urubici, Urupema e Lages. Além de, representar uma contribuição para com o grupo de pesquisadores do Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, que é pioneiro, atuando desde de 2014, em estudos de investigação da composição de méis, produzidos por *Apis mellifera*, no estado de Santa Catarina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar intralaboratorialmente um método para determinação simultânea de 14 ácidos orgânicos alifáticos em méis de melato de bracatiga (*Mimosa scabrella* Benth.) e florais do estado de Santa Catarina utilizando CZE.

1.1.2 Objetivos específicos

As atividades associadas ao objetivo geral do trabalho foram divididas em objetivos específicos, constituindo em:

- Otimizar a composição do eletrólito de corrida e avaliar os demais parâmetros inerentes a técnica utilizando a ferramenta de simulação Peakmaster®, afim de alcançar menor tempo de análise com separação em linha de base;
- Selecionar um co-íon e padrão interno adequado para o método proposto;
- Validar o método proposto em relação aos parâmetros de desempenho: conformidade do sistema, linearidade, efeito de matriz, precisão (intra e inter ensaio), exatidão, seletividade, robustez, LOD e LOQ, com base em recomendações da Eurachem e trabalhos publicados sobre o tema;
- Avaliar os parâmetros de validação e realizar o tratamento dos dados com o auxílio dos *softwares*: *Assistat*, *Statistic*, *Excel* e *Origin*.
- Aplicar o método desenvolvido e validado na análise simultânea de 14 AOA: maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiônico, em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e floral do estado de Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MEL: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E QUALIDADE

Como principal produto alimentício das abelhas melíferas tem-se o mel, que é produzido a partir do néctar das flores, de secreções de partes vivas de plantas ou de insetos sugadores destas plantas que ficam sobre as partes vivas das mesmas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000; CAMARGO; PEREIRA; LOPES., 2002; MENDES; MESQUITA, 2009).

A classificação do mel está diretamente associado à sua origem. A matéria-prima para produção dos méis de melato é oriunda da excreção de insetos da ordem Homoptera (ex. cochonilha) que sugam o fluído do floema das árvores. Esses insetos excretam um líquido adocicado na forma de gotas através do canal alimentar, o qual deposita-se na parte externa das folhas e em outras partes da planta. A abelha coleta o líquido e utiliza-o como matéria-prima para produção de mel (MOREIRA et al., 2011). Dessa maneira, o mel de melato de bracinga ocorre a partir do caule da bracinga (*Mimosa scabrella* Benth), em períodos bianuais, produzido pela *Apis mellifera* a partir do exsudato de cochonilhas.

O mel floral é obtido dos néctares das flores e ainda, pode ser classificado em unifloral ou monofloral, quando o néctar coletado origina-se de flores de uma mesma família, gênero ou espécie, ou multifloral e polifloral, quando o néctar coletado é decorrente de diferentes origens florais (BRASIL, 2000).

Os méis são misturas complexas, que consistem principalmente de frutose (em torno de 38%), glicose (em torno de 37 %) e água (em torno de 10-20%) (FRINK; ARMSTRONG, 2016; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011), além de pequenas quantidades de outros carboidratos (dissacarídeos, trissacarídeos e oligossacarídeos), e de minerais (ALQARNI et al., 2014), compostos fenólicos (NAYIK et al., 2016), vitaminas (KAYGUSUZ et al., 2016), proteínas (BRUDZYNSKI; SJAARDA; MALDONADO-ALVAREZ, 2013), compostos voláteis (REVELL; MORRIS; MANLEY-HARRIS, 2014), ácidos orgânicos (OHMENHAEUSER et al., 2013), entre outros compostos (BENTABOL MANZANARES et al., 2011).

Os méis são produtos mundialmente conhecidos, sendo muito apreciados desde a Grécia antiga, devido as suas propriedades: antioxidantes, antimicrobiana e anti-inflamatória (BOGDANOV et al., 2008; EL-KASED, 2016; KASSIM et al., 2010; MANDAL; MANDAL, 2011; NASUTI et al., 2006; TENORE et al., 2012), as quais são consideradas promotoras de saúde e portanto, os méis, tem sido utilizados no tratamento de feridas e queimaduras, distúrbios gastrointestinais, asma (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2016; LUKASIEWICZ; KOWALSKI; MAKAREWICZ, 2015) além do mel conferir efeitos cardioprotetores (KHALIL et al., 2015).

O sabor e aroma de méis, são fortemente dependentes de sua origem botânica (CAMARGO, 2002; CHUA, 2015; CONTI et al., 2007; MANTILLA et al., 2012; WIESE, 2005), e estão intimamente relacionados com a região geográfica em que se originou (BARONI et al., 2009). Além disso, a composição e qualidade do mel tornam-se influenciadas, pelas condições do meio ambiente, espécies de abelhas envolvidas na sua produção, processamento, maturação, manipulação, embalagem e tempo de armazenamento (BERTONCELJ et al., 2007; DA SILVA et al., 2016; DOMINGUEZ et al., 2016; RIZELIO et al., 2012a)

A microbiota do mel também sofre variações devido aos micro-organismos introduzidos pelas próprias abelhas e outros introduzidos de forma indesejada por falta de higiene na manipulação ou durante a extração e beneficiamento do mel (SCHLABITZ; FERREIRA DA SILVA; VOLKEN DE SOUZA, 2010). Assim, alguns componentes presentes no mel vêm das plantas, outros são adicionados por abelhas e outros ainda, são oriundos de reações bioquímicas ocorridas durante a maturação (IGLESIAS et al., 2004).

A limitada disponibilidade e o alto preço, principalmente do mel de melato, tornam-se meios atrativos para sua adulteração. Nesse sentido, a regulamentação por meio de normas de padronização dos méis é de fundamental importância para estabelecer a autenticidade e a qualidade desse produto para sua comercialização, evitando eventuais fraudes (DA SILVA et al., 2016; FEÁS et al., 2010; KELLY, J. D.; PETISCO, C.; DOWNEY, 2006).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, por meio da Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Além dos parâmetros físico-químicos relacionados a maturidade (açúcares redutores), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais e pólen) e deterioração (fermentação, acidez, atividade

diastásica e 5-hidroxiacetilfurfural) o regulamento estabelece a definição, classificação, composição, características sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas – critérios macroscópicos e microscópicos – pesos e medidas, rotulagem, amostragem e definição de métodos de análises que deverão ser seguidos (BRASIL, 2000).

Normalmente, a concentração de açúcares redutores, acidez, minerais, condutividade elétrica, umidade e 5-Hidroxiacetilfurfural (5-HMF), conforme representado na Tabela 1, são alguns parâmetros utilizados para avaliar diferenças entre o mel floral e mel de melato.

Tabela 1- Parâmetros utilizados para diferenciar as classes de mel floral e mel de melato.

Parâmetros	Mel floral	Mel de melato
Açúcares redutores ^a (glicose+frutose)	Mínimo 65 %	Mínimo 60 % para melato ou mel de melato e sua mistura com mel floral
Minerais (cinzas) ^a	Máximo 0,6 %	Máximo 1,2 % para melato ou mel de melato e suas misturas com mel floral
Umidade ^a	Máximo de 20 %	Máximo de 20 %
Condutividade elétrica ^b	Inferior a 0,8 mS/cm	Superior a 0,8 mS/cm
Acidez	Máximo de 50 mEq/Kg ^a ou Máximo de 40 mEq/Kg ^c	Máximo de 50 mEq/Kg ^a ou Máximo de 40 mEq/Kg ^c
5-HMF ^a	Máximo de 60 mg/Kg	Máximo de 60 mg/Kg

Fonte: ^aMAPA; ^bCODEX; ^cMERCOSUL

Legenda: 5-HMF: 5-Hidroxiacetilfurfural.

Os sete parâmetros e respectivos limites aceitáveis, representados na Tabela 1, são estabelecidos nas legislações nacionais e internacionais (BRASIL, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2001; MERCOSUL, 1999). Além disso, a cor, concentração de outros carboidratos, como a rafinose e melezitose, pH e rotação específica, também são parâmetros utilizados para avaliar a diferença entre as duas classes de méis porém, as legislações não os contemplam. Dessa maneira, os dados são obtidos por meio da literatura científica.

A cor é variável de quase incolor a pardo-escuro (BRASIL, 2000). Méis florais são, normalmente, mais claros que méis de melato, portanto, esse parâmetro pode ser determinado pela origem botânica e também depende do teor de cinzas (ou minerais), temperatura e tempo de armazenamento (PITA-CALVO; VÁZQUEZ, 2017).

Os carboidratos, principalmente os trissacarídeos rafinose e melezitose, comumente, não são encontrados em méis florais ou, quando encontrados, em concentrações muito reduzidas (KASKONIENE; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2010). Porém, em méis de melato a concentração de melezitose pode variar de 0,14 a 2,78 % (PRIMORAC et al., 2009) e concentrações inferiores a 0,55 % podem ser encontradas para rafinose, também em mel de melato (VICTORITA et al., 2008).

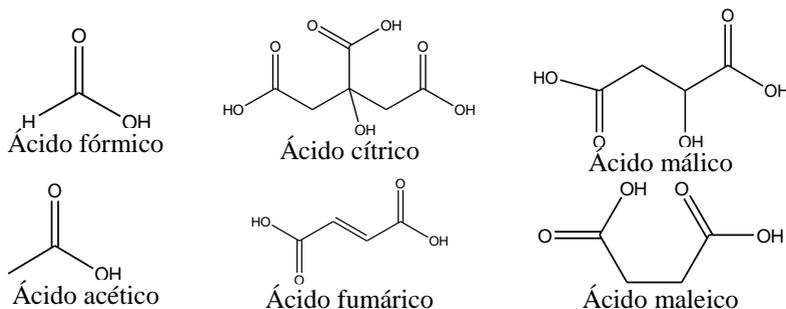
Méis florais possuem valores negativos de rotação específica e pH ácido, próximo de 4,0. Enquanto os méis de melato, possuem valores positivos de rotação específica e pH ácido em torno de 5,0 (CAMPOS et al., 2003; SILVA, F. S. M. F.; SILVA, S. M.; NETTO, 2011). O pH ácido pode limitar e/ou inibir o crescimento de micro-organismos, além de ser importante durante a estocagem, por influenciar na estabilidade e vida de prateleira, visto que, valores alterados de pH podem indicar a fermentação do mel (CAMPOS et al., 2003; SILVA, F. S. M. F.; SILVA, S. M.; NETTO, 2011; TERRAB et al., 2004). O pH ácido é devido, principalmente, à presença de ácidos orgânicos, ésteres e de íons inorgânicos (PITA-CALVO; VÁZQUEZ, 2017).

2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÉIS

Os AOA são compostos cíclicos ou acíclicos de baixa massa molar ($45-220 \text{ g mol}^{-1}$), ionizam-se negativamente em valores de pH entre 3-6 e, geralmente, são solúveis em água. Esses compostos químicos contêm um ou mais grupos carboxílicos, os quais podem ser classificados em: monocarboxílicos, dicarboxílicos e/ou tricarboxílicos (GALLI et al., 2003; PAPAGIANNI, 2011; YIN et al., 2015).

Os AOA, podem estar presentes em inúmeras matrizes, entre elas, frutas e vegetais (FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012), bebidas, incluindo sucos e vinhos (MATO et al., 2006b), queijos (ZEPPA; CONTERNO; GERBI, 2001), iogurtes (GÜZEL-SEYDIM et al., 2000), e méis (HAROUN et al., 2012; NOZAL et al., 2003a). Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas de alguns dos AOA comumente reportados na literatura para méis florais e de melato.

Figura 1- Representação estrutural de ácidos orgânicos alifáticos normalmente encontrados em méis de diferentes regiões geográficas.



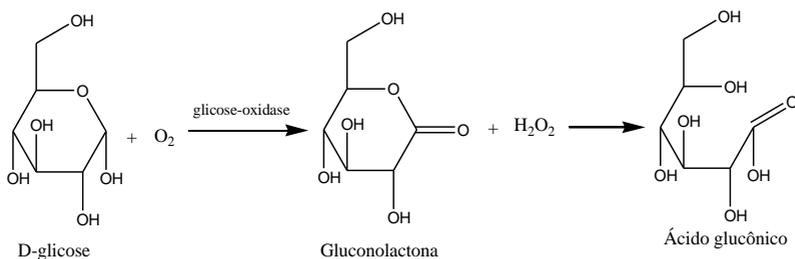
Fonte: Adaptado de Mato et al. (2006) e Ohmenhaeuser et al. (2013).

Os méis contêm AOA, normalmente, em concentrações que variam de 0,002 a 0,42 % (OHMENHAEUSER et al., 2013; TEZCAN et al., 2011). A presença desses compostos, ésteres, íons inorgânicos como o fosfato (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; NAVARRETE et al., 2005) e compostos voláteis, são responsáveis pela acidez dos méis. A acidez é um parâmetro que auxilia, principalmente, na avaliação do nível de deterioração do mel (KADRI; ZALUSKI; ORSI, 2017) e, segundo a legislação estabelecida pelo MAPA (BRASIL, 2000) e pelo MERCOSUL, a acidez não deve ultrapassar de 50 mEq/kg e 40 mEq/kg, respectivamente.

Além disso, os AOA fornecem contribuições importantes para as propriedades físico-químicas como a acidez, pH e condutividade elétrica (MATO et al., 2003, 2006a) e também para as propriedades sensoriais como o sabor e aroma (MATO et al., 2003; NAVARRETE et al., 2005; TEZCAN et al., 2011). Além dos AOA, compostos aromáticos, cetonas, álcoois e ésteres também contribuem fortemente para o aroma dos méis (APARNA; RAJALAKSHMI, 1999).

A presença dos AOA em méis são de origem pouco conhecida porém, alguns ácidos podem ser de ocorrência natural. Um exemplo, é o ácido glucônico que origina-se pela conversão do monossacarídeo D-glicose por meio da ação da enzima D-glicose oxidase (Figura 2), a qual provém da glândula hipofaríngeana das abelhas (MATO et al., 1997; MOREIRA; MARIA, 2001).

Figura 2- Oxidação da D-glicose a ácido glucônico catalisada pela enzima glicose-oxidase.



Fonte: Adaptado de Moreira et al., (2007).

O ácido glucônico em equilíbrio com a gluconolactona é (JONATHAN; WHITE, 1978), normalmente, o ácido majoritário em méis e constitui de 70 a 90 % dos ácidos orgânicos do mel (MOREIRA; MARIA, 2001). O ácido glucônico pode advir também da atividade metabólica de bactérias *Gluconobacter*, as quais, estão presentes no intestino da abelha. Durante o amadurecimento do mel, as *Gluconobacter* produzem grandes quantidades de ácido glucônico sob condições aeróbias e na presença de altas concentrações de glicose (MATO et al., 2003).

Em méis, as concentrações de ácido glucônico podem apresentar elevada variabilidade, isso porque, tal composto pode formar-se por meio da ação da enzima glicose-oxidase, presente na glândula hipofaríngea das abelhas (Figura 2), por ação bacteriana, ou ainda, estar presente na fonte que a abelha utilizou para produzir o mel como, o pólen das flores ou excreções de insetos sugadores das plantas. Alguns estudos têm demonstrado a variabilidade na concentração do ácido glucônico, quando determinado em pólen e méis de origem florais e de melato.

Recentemente o teor de AOA foi determinado em pólen de plantas (castanheiro, trigo serrano e carvalho) oriundas da Turquia. Dos oito AOA quantificados, o ácido glucônico foi majoritário com concentrações que variaram de 590,00 a 3.200,00 mg 100 g⁻¹ (KALAYCIOĞLU et al., 2017). Porém, em mel floral de castanha, oriundo da Província de Zonguldak na Turquia, o ácido glucônico apresentou concentração de 890,40 mg 100 g⁻¹, enquanto que, no mel floral de castanha oriundo da província de Eregli na Turquia, o ácido glucônico apresentou concentração de 1.093,0 mg 100 g⁻¹, (TEZCAN et al., 2011).

Em mel de melato de pinho oriundo da região de Mugla da Turquia, o ácido glucônico apresentou concentração de 346,70 mg 100 g⁻¹ (TEZCAN et al., 2011). Em mel de melato (*Quercus ilex*) originário de Valladolid, Espanha, o ácido glucônico apresentou concentração de 370,50 mg 100 g⁻¹ (NOZAL et al., 2003a)

A ocorrência natural de outros AOA nos méis, por exemplo o ácido acético, pode advir de uma fermentação aeróbia e/ou anaeróbia (TEZCAN et al., 2011). O mel é uma mistura com característica higroscópica (PRICA et al., 2014) sendo a água o segundo maior constituinte (BRASIL, 2000). Nesse sentido, a atividade de água (a_w) é um fator que determina a sobrevivência e/ou limitação do crescimento de micro-organismos nos méis, podendo levar ou não a deterioração por fermentação (ABRAMOVIC et al., 2008). O processo de fermentação resulta na formação de álcool e, na presença de oxigênio, o álcool desagrega-se em ácido acético e água (CHIRIFE; ZAMORA; MOTTO, 2006; PRICA et al., 2014).

Mato e colaboradores (2006) detectaram ácido acético em amostras de méis florais oriundas da região de Galicia, Espanha. Nas três amostras de méis florais (*Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp. e multifloral) a concentração total de ácido acético foi de 14,57 mg 100 g⁻¹ sendo que, o mel de *Castanea sativa* Miller apresentou concentração superior de ácido acético, quando comparado aos méis de *Eucalyptus* sp. e multifloral, representando 26,3 mg 100 g⁻¹ (MATO et al., 2006a). Para méis florais de lavanda e tomilho, ambos oriundos da região de Valência, Espanha, a concentração de ácido acético foi inferior a 0,01 mg 100 g⁻¹ (ESCRICHE et al., 2017). Para méis de melato de carvalho, *Quercus ilex* e suas misturas (carvalho + *Quercus ilex*) oriundos das regiões de Castilha La-Mancha e Extremadura, Espanha, o ácido acético apresentou concentrações inferiores a 0,1 mg 100 g⁻¹ para todas as amostras (CASTRO-VÁZQUEZ; DÍAZ-MAROTO; PÉREZ-COELLO, 2006).

Ainda, outros AOA presentes nos méis podem resultar de um processo fermentativo natural que, por exemplo, ocorre no sistema digestivo das abelhas. Olofsson e Vásquez (2008) descobriram uma nova flora bacteriana compostas por bactérias ácido lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, originadas no estômago de abelhas *Apis mellifera* (OLOFSSON; VÁSQUEZ, 2008). As bactérias ácido lácticas produzem ácido láctico durante a fermentação de carboidratos e são consideradas um grupo de bactérias benéficas (KALAYCIOĞLU et al., 2017).

Ressalta-se novamente que, o ácido láctico ou outros AOA podem não ser natural da flora bacteriana das abelhas ou da decorrência de um processo fermentativo isolado mas, ser oriundo das fontes florais, secreções de plantas ou excreções de insetos, os quais são coletados pelas abelhas para produção de méis. Recentemente Kalayioğlu e colaboradores (2017) verificaram a presença de ácido láctico em pólen de plantas (castanheiro, trigo serrano e carvalho) com concentrações que variaram de 71,00 a 120,00 mg 100 g⁻¹. Além do ácido láctico, os ácidos: oxálico, tartárico, málico, cítrico, succínico e acético também foram quantificados nos pólenes de plantas (KALAYCIOĞLU et al., 2017).

O ácido láctico foi investigado em méis florais (MATO et al., 2006a; NOZAL et al., 2003a, 2003b) e mel de melato (desconhecido) (NOZAL et al., 2003a, 2003b), todos oriundos da Espanha. Porém, dos três estudos que investigaram a presença do ácido láctico, apenas Mato e colaboradores (2006) detectaram e quantificaram esse composto em três amostras de méis florais (*Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp. e multifloral). Esse composto foi majoritariamente detectado na amostra de mel de *Castanea sativa* Miller e apresentou concentração média de 34,51 mg 100 g⁻¹.

A presença de ácido fórmico nos méis pode ocorrer a partir de um produto de degradação indesejável, o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF). A partir da hidratação do 5-HMF com duas moléculas de água, ocorre a formação de uma molécula de ácido fórmico e uma molécula de ácido levúrico (CAVIA et al., 2007). Além disso, a concentração elevada do ácido fórmico nos méis, pode ser devido a utilização desse ácido no tratamento aplicado nas colméias contra a infestação por *Varroa* que podem acumular-se na cera e em menor extensão, nos méis (BOGDANOV et al., 2002; MATO et al., 2003).

O ácido fórmico foi quantificado em méis florais (eucalipto, laranjeira, pinho, entre outros) e mel de melato (desconhecido), os quais, foram selecionados aleatoriamente por inspetores de alimentos de Baden-Württemberg, Alemanha, incluindo méis comerciais e frescos (coletados diretamente nas colméias). As concentrações de ácido fórmico variaram de 6,00 a 71,00 mg 100 g⁻¹ para méis florais e para mel de melato a concentração de ácido fórmico foi de 11,00 mg 100 g⁻¹ (OHMENHAEUSER et al., 2013). Esse composto foi quantificado em mel de melato de pinho oriundo da região de Mugla, Turquia, com concentração de 8,93 mg 100 g⁻¹ (TEZCAN et al., 2011), a qual está próxima a concentração encontrada por Ohmenhaeuser e colaboradores (2013).

Além dos AOA relatados anteriormente, outros ácidos foram quantificados em concentrações relativamente superiores em amostras de méis, entre eles, cítrico, málico e succínico. Em méis florais as concentrações médias dos ácidos cítrico, málico e succínico foram de 13,70; 14,55 e 3,19 mg 100 g⁻¹, respectivamente (MATO et al., 2006a). Em mel de melato os ácidos cítrico e succínico, ambos, apresentaram concentração de 28,00 mg 100 g⁻¹ (OHMENHAEUSER et al., 2013) e o ácido málico apresentou concentração de 25,70 mg 100 g⁻¹ (TEZCAN et al., 2011).

Normalmente, méis florais apresentam menores concentrações de AOA em comparação com méis de melato (HAROUN et al., 2012a; NOZAL et al., 2003a, 2003b). Dessa maneira, alguns AOA podem ser utilizados como substâncias para diferenciar os méis de acordo com sua origem botânica e/ou geográfica. Um exemplo é o ácido cítrico, normalmente, utilizado como um parâmetro confiável de diferenciação entre mel floral (menores teores) e mel de melato (maiores teores) (HAROUN et al., 2012; MATO et al., 2006a; SUÁREZ-LUQUE et al., 2002).

A origem de todos os AOA nos méis também não é conhecida, embora muitos deles pareçam ser intermediários naturais nas vias metabólicas de micro-organismos, do ciclo de Krebs (ácidos: cítrico, succínico, glutárico, fumárico e oxaloacético) ou de reações enzimáticas. Ainda, podem ser sintetizados a partir de glicose, frutose e sacarose do néctar, pela ação de enzimas de abelhas operárias, ou podem vir diretamente de fonte de néctar, pólen ou secreção de plantas e excreção de insetos sugadores de plantas (MATO et al., 2003; YIN et al., 2015).

2.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM MÉIS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é amplamente empregada na identificação e quantificação de AOA em méis (HAROUN et al., 2012; SUÁREZ-LUQUE et al., 2002). No entanto, a ciência das separações, em termos de instrumentação analítica, contemplou grandes avanços tecnológicos nos anos 80 devido à implementação de uma eficiente técnica instrumental de separação, a CE (TAVARES, 1997).

A CE é uma técnica de separação que utiliza essencialmente um capilar (normalmente de sílica fundida) onde a amostra é introduzida na

presença de uma solução tampão (eletrólito condutor) e uma diferença de potencial é aplicada. O campo elétrico gerado no capilar faz com que os componentes da amostra migrem de acordo com sua mobilidade (velocidade e direção) determinada pela sua massa e carga (DA SILVA et al., 2007; JAGER; TAVARES, 2001; LANDERS, 2008; TAVARES, 1997).

Na CE, é possível empregar diversos modos de separação, dos quais podemos destacar a CZE. Esse modo é um dos mais utilizados na separação de inúmeros compostos, entre eles, ânions inorgânicos, cátions metálicos, ácidos orgânicos, carboidratos, nitrato e nitrito (DELLA BETTA et al., 2016; DOMINGUEZ et al., 2016; NAVARRO-PASCUAL-AHUIR et al., 2015; TRAVASSOS LEMOS; CASSELLA; DE JESUS, 2015) em diferentes matrizes.

Para outras informações relacionadas ao princípio da técnica, introdução da amostra no capilar, sistema (tipo de detectores) e modo de detecção (direto ou indireto); e EOF (co-eletrosmótico e contra-eletrosmótico) consultar Apêndice A.

Na Tabela 2 são apresentados estudos de determinação de AOA em méis por meio de diferentes técnicas analíticas. Devido à escassez de trabalhos, os resultados compreendem os últimos 10 anos e ao todo foram quantificados 19 AOA em méis florais e 13 AOA em méis de melato de diferentes regiões geográficas. Além disso, na Tabela 1 é informado o preparo de amostras realizado em cada trabalho e os LOD e LOQ das técnicas empregadas na determinação dos AOA.

Tabela 2- Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes classes de méis e regiões.

Referência	Classe/ País	Técnica/ Tempo	Preparo de Amostra	Ácidos Orgânicos Alifáticos investigados	Ácidos Orgânicos Alifáticos Encontrados		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
					Floral	Melato		
					Continuação.			
Suárez-Luque et al., (2002)	Florais/ Espanha	HPLC- UV-vis/ (~14min)	Diluição em água, ajuste de pH 10,5 (NaOH 0,1 M) e pH 5,0 (HCl 0,1 M). Posterior extração em fase sólida	Málico, maleico, cítrico, succínico e fumárico	Todos	-	0,006-7,57	0,025-10,93
Mato et al., (2006)	Florais/ Espanha	CZE- UV-vis/ (~4min)	Diluição em água e ajuste de pH 10,5 (NaOH 0,1 M) e pH 5,0 (HCl 0,1 M)	Oxálico, fórmico, tartárico, málico, succínico, maleico, glutárico, pirúvico, acético, lático, cítrico, butírico, benzoico*, sórbico, ascórbico e glucônico	Oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, acético, lático, cítrico e glucônico	-	0,40-38,0	12,0 -78,0
Navarrete et al. (2005)	Florais/ Espanha	CZE- UV-vis/ (~18min)	Diluição em água	Tartárico, oxálico, fumárico, pirúvico, maleico, propiônico, málico e lático	oxálico, fumárico, maleico e málico	-	0,10-15,23	0,33 -50,87
Tezcan et al., (2011)	Florais e melato/ Turquia	CZE- DAD/ (~6min)	Diluição em água	Oxálico, fórmico, málico, cítrico, succínico e glucônico	Fórmico, málico, cítrico, succínico e glucônico	Fórmico, málico, cítrico e glucônico	-	-

Legenda: Eletroforese Capilar de Zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*); Detector Ultravioleta-Visível (do inglês, *UV-Vis detector*); Detector de Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*); LOD – limite de detecção em solução aquosa; LOQ – limite de quantificação em solução aquosa. (*) – composto aromático; (~) – próximo.

Tabela 2- Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes classes de méis e regiões.

Referência	Classe/ País	Técnica/ Tempo	Preparo de amostra	Ácidos Orgânicos investigados	Ácidos Orgânicos Encontrados		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
					Floral	Melato		
					Continuação.			
Nozal et al., (2003a)	Florais e melato/ Espanha	HPLC-UV- vis/ (~60min)	Extração líquido-líquido	Oxálico, D-glucurônico, cítrico, galacturônico, D-glucônico, pirúvico, málico, citramalico, quínico, succínico, lático, fórmico, glutárico, propiônico e butírico	D-glucurônico, oxálico, cítrico, galacturônico, D-glucônico, quínico, fórmico, glutárico e propiônico	Oxálico, cítrico, D-glucônico, glutárico e propiônico	0,05-21,75	0,18-72,5
Nozal et al., (2003b)	Florais e melato/ Espanha	HPLC-DAD/ (~60min)	Extração líquido-líquido	Oxálico, D-glucurônico, cítrico, galacturônico, propiônico, pirúvico, málico, citramalico, quínico, D-glucônico, lático, fórmico, glutárico, butírico	Oxálico	Oxálico	0,05-21,75	0,18-72,5
Sanz et al., (2005)	Florais e melato/ Espanha e Itália	GC-MS/ (~12min)	Extração líquido-líquido	Cítrico, quínico e glucônico	Quínico e glucônico	Quínico e glucônico	-	-

Legenda: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*); Detector Ultravioleta-Visível (do inglês, “*UV-Vis detector*”); Detector de Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*); Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS, do inglês “*Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*”) LOD – limite de detecção em solução aquosa; LOQ – limite de quantificação em solução aquosa; (~) – próximo.

Tabela 2- Ácidos orgânicos alifáticos investigados e detectados em diferentes classes de méis e regiões.

Referência	Classe/ País	Técnica/ Tempo	Preparo de amostra	Ácidos Orgânicos Investigados	Ácidos Orgânicos Encontrados		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
					Floral	Melato		
					Conclusão.			
Ohmenhaeuser et al., (2013)	Florais e melato/ Alemanha	NMR (n.i)	Diluição em água, ajuste de pH 4,5 (NaOH 1 M)	Fórmico, ftálico, fumárico, pirúvico, tartárico, málico, cítrico, succínico	Fórmico, fumárico, pirúvico, tartárico, málico, cítrico, succínico	Fórmico, fumárico, tartárico, cítrico, succínico	-	-
Haroun et al., (2012)	Florais e melatos/ Turquia	HPLC- DAD (n.i)	Diluição em água, ajuste de pH 10,5 (NaOH 0,1 M) e pH 5,0 (HCl 0,1 M). Extração em fase sólida	Tartárico, málico, maleico, cítrico, succínico, fumárico e ascórbico	Todos	Todos	-	-
Trabalho proposto	Florais e melatos/ Brasil	CZE/ DAD (~9min)	Diluição em água	Maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiónico	Maleico, malônico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiónico	Maleico, malônico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiónico	0,07-0,72	0,25-2,42

Legenda: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*); Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*); Detector de Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*); Eletroforese Capilar de Zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*); n.i – não informado; LOD – limite de detecção em solução aquosa; LOQ – limite de quantificação em solução aquosa; (~) – próximo

A partir dos estudos relatados na Tabela 2, foi observado que três trabalhos empregaram a técnica de CE para determinação de AOA em méis, enquanto que a técnica de HPLC foi utilizada quatro vezes. Embora à HPLC seja uma técnica mais sensível, principalmente por apresentar baixos LOD e LOQ, os quais podem apresentar variação de 0,0064 a 7,57 mg L⁻¹ e 0,025 a 10,93 mg L⁻¹, respectivamente (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002). A CE apresenta, na maioria das vezes, maior eficiência e resolução, menor tempo de análise, custo operacional reduzido e pouco consumo de reagente e amostra, minimizando a geração de resíduos. Devido à essas vantagens, o emprego da CE apresenta um futuro promissor no controle de qualidade de alimentos, principalmente nos méis.

Na Tabela 2 é apresentado resultados de dois trabalhos, que por meio da técnica HPLC, determinaram cinco (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002) e 15 AOA em méis (NOZAL et al., 2003a) e os tempos de análise corresponderam, aproximadamente, em 14 e 60 minutos, respectivamente. Porém, quando empregado a técnica CE em outros dois trabalhos também, para determinação de 16 (MATO et al., 2006a) e oito (NAVARRETE et al., 2005) AOA em méis (Tabela 2) os tempos de separação foram de 4 a 18 minutos, respectivamente, demonstrando que a CE obteve menores tempos de análises.

Mato e colaboradores (2006), apesar de determinar por CE, 15 AOA simultaneamente em, aproximadamente 4 minutos, demonstrou ser um trabalho mais laborioso que o trabalho proposto nessa dissertação, devido ao preparo de amostra apresentar mais de uma etapa, com preparo de diversas soluções e elevado consumo de reagentes e, apesar de não serem exatamente os mesmos ácidos determinados nesta dissertação, os eletroferogramas apresentados por Mato e colaboradores (2006) apresentaram resolução inferiores.

Outras informações relevantes que foram observadas na Tabela 2 estão relacionadas ao preparo de amostras. Os preparos de amostras realizados por Suarez-Luque et al. (2002), Haroun et al. (2012) e Mato et al. (2006) foram desenvolvidos similarmente. Cada estudo realizou dois ajustes de pH, sendo que, o primeiro ajuste (pH ~ 10,5) com agitação por 10-15 minutos a temperatura ambiente foi realizado para garantir a hidrólise total da D-glucono- δ -lactona ao ácido D-glucônico (MATO et al., 2006a) e para evitar interferências na linha de base (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002), consequentemente favorecendo a repetibilidade dos tempos de migração dos AOA (MATO et al., 2006a).

Além disso, Suarez-Luque et al. (2002) e Haroun et al., (2012) adicionaram a etapa de extração em fase sólida, a qual objetiva a remoção

de interferentes da matriz, concentração e isolamento dos analitos, permitindo que compostos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos como CE por exemplo. Apesar de permitir uma melhoria na detectabilidade do método, a extração em fase sólida, resulta em elevado tempo total de análise, altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais e a dificuldade em selecionar um solvente adequado para a aplicação desejada (JARDIM, 2010).

Nozal et al., (2003a,b) realizaram o preparo de amostras por meio de extração líquido-líquido ou também conhecida com extração por solvente. Esse procedimento demonstrou maior simplicidade também por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, e tempo de preparo inferior, quando comparado à extração em fase sólida, porém não mais vantajosa, visto que, ocorreu a utilização de ácido sulfúrico 2 M e posteriormente adição de ácido fosfórico à solução, visto que. Dessa maneira, também ocorreu geração de resíduos químicos.

Contudo, foi observado que apenas dois trabalhos (NAVARRETE et al., 2005; TEZCAN et al., 2011) realizaram o preparo de amostra simples, apenas com diluição em água, eliminando diversas etapas de ajustes de pH e extrações, proporcionando um preparo mais rápido, econômica e ambientalmente viáveis. Esse destaque também pode ser dado ao trabalho proposto que por meio de uma diluição em água desenvolveu um rápido e simples preparo de amostra.

Em relação as técnicas de Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS, do inglês, *Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), ambas, foram empregadas apenas uma vez para determinação de AOA em méis, provavelmente devido ao laborioso preparo e/ou tratamento da amostra e aos elevados custos operacionais, comparados a CE e HPLC.

2.4 RACIONALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR

A escolha das espécies utilizadas no desenvolvimento do eletrólito de corrida (BGE do inglês, *Background Electrolyte*) e o conhecimento das características químicas dos analitos, são etapas indispensáveis na otimização do método. Dessa maneira, as mobilidades e pK_a dos analitos, além da escolha de um padrão interno (I.S. do inglês, *Internal Standard*) e co-íon que apresentem mobilidade iônica próxima a do analito de

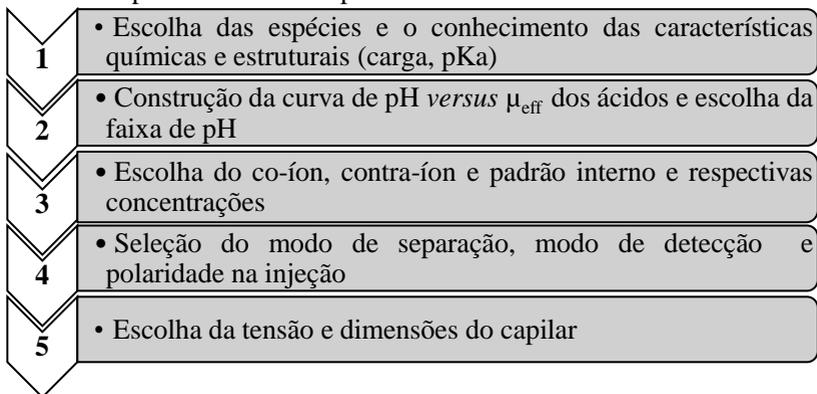
interesse, são as principais características que apresentam influências sob a separação dos AOA.

Após a geração de um campo elétrico ao longo do tubo capilar, os analitos migram com velocidade constante, como consequência de suas mobilidades (DA SILVA et al., 2007). Portanto, cada componente desloca-se com uma mobilidade (μ) característica, recebendo uma denominação correspondente. Por exemplo, a mobilidade iônica ou eletroforética é a mobilidade dos íons simples (TAVARES, 1995) e a mobilidade efetiva (μ_{eff}) é a mobilidade de um íon em um determinado pH (LANDERS, 2008; TAVARES, 1995).

O pK_a é uma constante de dissociação ácida e portanto, reflete o grau de ionização das moléculas em diferentes valores de pH. Dessa maneira, a partir do conhecimento do pK_a dos compostos será possível prever o comportamento das substâncias em solução, com diferentes valores de pH (VÖLGYI et al., 2007).

Para o desenvolvimento de métodos em CZE não há um protocolo a ser seguido porém, de maneira racionalizada algumas etapas podem ser seguidas, com critérios que devem ser considerados para a obtenção, principalmente, de um BGE com adequado desempenho na separação dos analitos de interesse e, pela escolha de parâmetros instrumentais que assegurem a obtenção de eletroferogramas com adequada eficiência e resolução. Na Figura 3 é demonstrada as principais etapas, normalmente, seguidas para o desenvolvimento do método.

Figura 3 – Racionalização de etapas seguidas durante o desenvolvimento de método por eletroforese capilar.



Fonte: Adaptado de Della-Betta (2016).

As etapas 1, 2 e 3 estão associadas ao BGE e as etapas 4 e 5 associadas aos parâmetros instrumentais da CE. A maneira de como os dados foram obtidos, bem como, as justificativas das escolhas consideradas em cada etapa, são apresentados nos materiais e métodos (seção 3.7) e resultados e discussão desse trabalho (seção 5.1).

2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EM CZE UTILIZANDO SIMULAÇÃO

Desenvolvido por Gaš e colaboradores (2005), o *software* de simulação PeakMaster[®] é uma ferramenta importante que pode ser utilizada como suporte no desenvolvimento de métodos em CZE. Este *software* permite a simulação de separações eletroforéticas, demonstrando normalmente, grande similaridade com os eletroferogramas obtidos experimentalmente e possibilita a escolha de eletrólitos e analitos, uma vez que, o PeakMaster[®] possui um banco de dados com inúmeras moléculas de diferentes características que podem ser incluídas na simulação do método proposto. Além disso, é possível incluir outras moléculas no banco de dados por meio da literatura ou experimentalmente, desde que conhecidos os valores de pK_a e mobilidade da espécie ionizada.

O *software* possibilita a simulação por detecção direta ou indireta, além de fornecer informações sobre outros parâmetros durante a simulação, tais como pH, força iônica, condutividade, resistividade e capacidade tamponante do BGE. O uso desse *software* promove grande vantagem por fornecer informações sobre a simulação do método que será proposto sem a necessidade do consumo de reagentes e como consequência a minimização na geração de resíduos químicos.

Devido a potencialidade dessa ferramenta de simulação, nos últimos anos o PeakMaster[®] vem sendo empregado no desenvolvimento de métodos por CZE para separação de carboidratos (frutose, glicose e sacarose) e cátions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) em mel floral (RIZELIO et al., 2012a, 2012b), de ácidos orgânicos (maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, succínico e acético) em cachaça (AZEVEDO et al., 2014), histamina em atum (VITALI et al., 2013), nitrato e nitrito em produtos cárneos (DELLA BETTA et al., 2016) e também foi aplicado no trabalho proposto, visto que, até o momento o PeakMaster[®] não havia sido utilizado para simular AOA nas matrizes estudadas.

2.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a interpretações e decisões desastrosas, além de prejuízos financeiros irreparáveis em todas as áreas de análises. Assim, quando um novo método é desenvolvido deve-se avaliar parâmetros que comprovem seu adequado desempenho e a confiabilidade dos dados obtidos, processo conhecido como validação analítica (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO; FERREIRA, 2008; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A valiação pode ser definida como um processo de confirmação de que os requisitos específicos ou o método em avaliação para um determinado uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2003; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016). Protocolos e guias internacionais (Eurachem, AOAC) e nacionais (Inmetro, Anvisa) são recomendados e podem ser utilizados no processo de validação de métodos analíticos que dividem-se em intralaboratorial e interlaboratorial.

Métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (INMETRO, 2016; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005). Além disso, existe uma série de parâmetros de desempenho analítico a serem avaliadas para garantir a adequação do método ao uso pretendido (INMETRO, 2016), sendo eles, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LOD, LOQ, efeito de matriz e robustez (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

2.6.1 Conformidade do sistema

Apesar dos protocolos e guias internacionais e nacionais não contemplarem a avaliação da conformidade do sistema, a mesma deve ser avaliada antes da execução de experimentos de validação ou análises de amostras, para verificar se o sistema utilizado é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável antes ou durante a análise de amostras desconhecidas (RIBANI et al., 2004).

A conformidade do sistema é recomendada como um componente de avaliação em qualquer análise e/ou técnica (cromatografia, eletroforese capilar, titulometria, etc.) e pode ser definida como um conjunto de testes (RIBANI et al., 2004) incluindo: sistema eletroforético, calibração e manutenção do equipamento quando empregado a CE, por exemplo. Pode ser avaliada por meio de dez injeções consecutivas de uma solução

aquosa e I.S. A avaliação dos resultados pode ser feita por meio do CV % para área e tempo de migração corrigidos dos picos (FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008).

2.6.2 Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor e maior concentração de analito no qual o método pode ser aplicado (INMETRO, 2016). A linearidade corresponde a capacidade do método, dentro de uma dada faixa, em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra (ANVISA, 2017; BRASIL, 2003; INMETRO, 2016). A equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

Recomenda-se que a curva analítica seja contruída com no mínimo cinco (Anvisa 2017), seis (Eurachem 2014; Thompson 2002) ou sete (Inmetro 2016) pontos uniformemente distribuídos e em triplicata (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O equilíbrio da distribuição dos níveis ao longo da faixa é importante, pois pode influenciar na identificação de valores extremos (*outliers*) (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível obter o coeficiente de determinação R^2 (RIBANI et al., 2004). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, porém não é suficiente para assegurar o ajuste da curva ao modelo linear ou indicar a linearidade, visto que, modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

A linearidade de um método não pode ser avaliada apenas por inspeção visual do gráfico dos resultados (INMETRO, 2016) mas, verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa por meio do teste de ajuste do modelo linear (RIBANI et al., 2004). O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é recomendando pela maioria dos protocolos de validação (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) que por meio da análise do gráfico dos resíduos, o método permitirá detectar problemas no ajuste da curva, como os desvios da linearidade (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). A verificação de tais premissas podem ser avaliadas por diversos testes incluindo: Teste de Grubbs para verificação dos resíduos, Teste de Shapiro-wilk para verificação da normalidade, Teste de Cochran para verificação da homocedasticidade e Teste de Durbin-Watson para verificação da independência dos resíduos.

2.6.3 Efeito de matriz

A matriz da amostra pode conter diversos componentes que interferem no desempenho da medição, os quais, podem aumentar ou reduzir o sinal analítico, comprometendo o resultado (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2016). O método de adição de padrão é o mais indicado para avaliar o efeito de matriz em amostras desconhecidas, complexas e na ausência de amostras brancas (HARRIS, 2008).

O método de adição de padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da(s) substância(s) de interesse a quantidades conhecidas da amostra. O efeito de matriz deve ser conduzido de forma semelhante ao procedimento para curva de solução aquosa (mesma diluição respeitando a faixa de concentração e com igual número de pontos) e nesse caso, a curva de calibração em matriz deverá ser relacionada as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A curva de calibração em matriz também deve ser avaliada quanto ao parâmetro de linearidade (verificação de resíduos, normalidade, homoscedasticidade e independência) e caso tal parâmetro seja confirmado, para assegurar maior confiabilidade e qualidade dos resultados obtidos, além da inspeção visual, o efeito de matriz pode ser avaliado por meio do teste t (t -Student), sendo que, para saber qual tipo de teste t utilizar, aplica-se o teste F (Fischer-Snedecor) (SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, 1989). O teste F é utilizado para verificar as variâncias entre dois conjuntos de dados diferentes e compará-los utilizando os testes de hipóteses.

2.6.4 Seletividade

A seletividade representa a capacidade do método em detectar e distinguir o(s) analito(s) de interesse na presença de outros analitos interferentes, presentes em matrizes complexas (INMETRO, 2016). Esse

parâmetro pode ser avaliado experimentalmente no equipamento (por exemplo, eletroforese capilar) e/ou de forma teórica utilizando a ferramenta de simulação Peakmaster[®]. No entanto, para a utilização do Peakmaster[®] é necessário o conhecimento prévio da composição da matriz para poder avaliar os possíveis analitos que poderão atuar como compostos interferentes.

2.6.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade de concordância entre os resultados obtidos por meio de ensaios independentes sob condições estipuladas durante a validação (ANVISA, 2017; BRASIL, 2003). A precisão pode ser classificada em: repetibilidade ou precisão intra-ensaio quando os resultados dos ensaios independentes são obtidos no mesmo laboratório, com o mesmo equipamento, pelo mesmo analista e em curto período de tempo; e precisão intermediária ou precisão inter-ensaio quando os resultados dos ensaios independentes são obtidos no mesmo laboratório por diferentes equipamentos, ou diferentes analistas ou em dias diferentes (INMETRO, 2016).

Os valores de CV indicam quão estável é o sistema de medição, qual a condição do equipamento e quão bem selecionados os possíveis parâmetros avaliados. Além disso, os parâmetros de medida do CV irão depender da técnica empregada para análise, por exemplo, recomenda-se os parâmetros área do pico e tempo de migração quando empregado a técnica de eletroforese capilar (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

2.6.6 Exatidão

A proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro é denominado exatidão de um método analítico (BRASIL, 2003). A exatidão pode ser avaliada por meio de ensaios de recuperação aparente devido a maior simplicidade. A recuperação expressa uma estimativa de concentração conhecida de analito adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2017; BRASIL, 2003). Os critérios de aceitação para percentuais de recuperação e CV % obtidos devem ser justificados conforme critérios preconizados (ANVISA, 2017).

2.6.7 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ representam a menor concentração da substância em avaliação que pode ser detectada e medida usando um determinado procedimento experimental (FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008). As diretrizes oficiais apresentam diferentes abordagens para estimar esses limites, mas deixam o analista livre para escolher (RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007). Dessa maneira, os LOD e LOQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008)

Especialmente, o método relação sinal-ruído, utiliza a relação sinal-ruído através do cálculo do desvio padrão da linha de base (ruído) e da altura do pico (sinal) dos analitos. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 para LOD e 10:1 para LOQ, proporções geralmente aceitas como estimativas desses limites, respectivamente (FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008; RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007).

2.6.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Durante o desenvolvimento do método, todas as possíveis variações de condições experimentais, que podem ocorrer durante a rotina analítica, devem estar respaldadas. Constatando-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

Segundo o Inmetro (2016) a avaliação da robustez é um parâmetro opcional dentro do estudo de validação, porém esse parâmetro fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira, sendo que, quanto maior for a robustez de um método, ou seja, praticamente insensível a pequenas variações, maior será a confiança quanto à sua precisão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões de grau analítico utilizados no preparo das soluções estoque de AOA: maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, glucônico, glutárico, succínico, acético e propiônico, bem como, ácido ftálico, ácido glioxílico monoidratado, TRIS (Do inglês - Tris(hydroxymethyl)aminomethane) e CTAB (Do inglês -Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) utilizados no preparo do BGE, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, E.U.A.), além de cloreto de cálcio (CaCl_2) adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os ácidos oxálico e aspártico utilizados na avaliação da seletividade, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, E.U.A.). Hidroxido de sódio (NaOH) utilizado para condicionamento do capilar e metanol utilizado no preparo de soluções estoque foram adquiridos da marca Neon (São Paulo, SP, Brasil), além de água ultrapurificada Milli-Q[®] utilizada nas demais soluções e para diluições de amostra e condicionamento do capilar.

3.2 Preparo das soluções

As soluções estoque dos AOA: maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, lático, glucônico, succínico, propiônico e acético, foram preparadas independentemente, em concentrações que variaram de 6.005,0 a 21.814,0 mg L^{-1} em 10 mL de água ultrapurificada Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) e os ácidos oxálico e aspártico em concentrações de 1.806,6 mg L^{-1} e 2.262,2 mg L^{-1} , respectivamente, em 10 mL de água ultrapurificada Milli-Q[®]. Os ácidos fumárico e glutárico foram preparados independentemente, em concentração de 11.607,0 mg L^{-1} e 13.212,0 mg L^{-1} , respectivamente em 10 mL de de metanol. Todas as soluções individuais foram armazenadas a 4 ± 2 °C. Posteriormente, para a construção da curva de calibração foi retirado uma alíquota de cada solução individual para o preparo de uma solução, contendo todos os AOA na concentração desejada, sendo as concentrações das soluções finais da faixa de trabalho apresentadas na Tabela 3. A faixa de trabalho foi definida a partir de testes prévios das amostras de méis.

Tabela 3 - Concentrações dos ácidos orgânicos alifáticos em cada nível da curva de calibração.

AOA	Níveis (mg L ⁻¹)						
	1	2	3	4	5	6	7
Maleico	3,22	6,45	12,90	25,79	38,69	51,59	64,48
Malônico	2,89	5,78	11,56	23,12	34,69	46,25	57,81
Fumárico	3,22	6,45	12,90	25,79	38,69	51,59	64,48
Tartárico	4,17	8,34	16,69	33,35	50,03	66,71	83,38
Fórmico	1,26	2,52	5,05	10,04	15,14	20,19	25,24
Cítrico	5,34	10,67	21,35	42,69	64,04	85,39	106,74
Malico	3,72	7,45	14,90	29,80	44,70	59,60	74,49
Glicólico	2,09	4,18	8,36	16,71	25,07	33,43	41,79
Lático	2,50	5,00	10,01	20,02	30,03	40,04	50,04
Glucônico	6,06	12,12	24,24	48,48	72,71	96,96	121,19
Succínico	3,28	6,56	13,12	26,24	39,36	52,48	65,61
Glutárico	3,67	7,34	14,68	29,36	44,04	58,72	73,40
Acético	1,67	3,34	6,67	13,34	20,02	26,69	33,36
Propiônico	2,08	4,16	8,31	16,63	24,94	33,25	41,57
I.S.	14,81	14,81	14,81	14,81	14,81	14,81	14,81

Legenda: Padrão interno (I.S. do inglês, *Internal Standard*): ácido glioxílico.

Fonte: Próprio autor.

As soluções estoque de NaOH 1 mol L⁻¹ e TRIS 100 mmol L⁻¹ foram preparadas pela pesagem direta de 1 g em 25 mL e 0,12 g em 10 mL de água ultrapurificada Milli-Q[®], respectivamente. As soluções estoque de CTAB e CaCl₂ ambas 20 mmol L⁻¹ foram preparadas a partir de 0,18 g em 25 mL e 0,03 g em 10 mL de água ultrapurificada Milli-Q[®], respectivamente. O BGE foi preparado no início de cada dia de trabalho com a seguinte composição: ácido ftálico 20,0 mmol L⁻¹, TRIS 14,0 mmol L⁻¹, CTAB 1,6 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 1,0 mmol L⁻¹ no volume final de 10 mL de solução, resultando diretamente em pH 3,3. Para auxiliar na solubilidade do BGE, foi utilizado um banho ultrassônico (Cristófoli Biossegurança) a 25 °C por 15 min. O ácido glioxílico foi utilizado como I.S. no preparo da curva analítica na concentração final de 14,81 mg L⁻¹.

3.3 Amostras

As amostras de mel de melato de bracinga (em favos) e mel floral (forma líquida) foram obtidas diretamente dos apicultores das

idades de Lages, São Joaquim, Urubici, Urupema e Bom Retiro, durante a safra de 2016. Após a coleta, especialmente os favos, foram acondicionados em sacos plásticos, identificados e ambas as amostras transportadas a temperatura ambiente para o Laboratório de Química de Alimentos, localizado no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. No laboratório, as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) (favos) foram drenadas manualmente, acondicionadas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e, ambas as amostras (floral e melato), foram armazenadas em temperatura controlada de congelamento ($-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

3.4 Preparo de amostras

As amostras foram descongeladas, homogeneizadas e preparadas cinco misturas de cada classe (floral e melato). Cada mistura constituiu de uma, duas e/ou três amostras de mesma região, de acordo com a disponibilidade, misturadas na mesma proporção (0,5 g de mel), conforme dados da Tabela 4.

Tabela 4- Informações das amostras de mel floral e de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) utilizadas no preparo das misturas.

Mel Floral			
Mistura	Local	Mês de coleta	ID apiário
1	Lages	09 e 11	FLG2, FLG3
2	São Joaquim	08 e 10	FSJ1, FSJ5
3	Urubici	11	FUB1, FUB4
4	Urupema	01 e 06	FUP1, FUP4
5	Bom retiro	04	FBR1, FBR2
Mel de Melato de Bracatinga			
Mistura	Local	Mês de coleta	ID apiário
1	Lages	05	MLG3
2	São Joaquim	06	MSJ1, MSJ2
3	Urubici	05	MUB1, MUB2, MUB3
4	Urupema	04 e 05	MUP2, MUP5, MUP6
5	Bom Retiro	06	MBR1, MBR2, MBR3

Legenda: F, Floral; M, Melato; LG, Lages; SJ, São Joaquim; UB, Urubici; UP, Urupema; BR, Bom Retiro; ID, Identificação. Os números: 1, 2, 3, 4 e 5 relaciona-se aos apiários.

Após a realização das cinco misturas para cada classe de mel (floral e melato), uma alíquota de $0,3 \pm 0,01$ g de cada mistura de mel foi colocada em microtubo de polipropileno com capacidade para 2 mL e adicionados $1,2 \pm 0,01$ g de água ultrapurificada Milli-Q[®]. As amostras foram homogeneizadas usando um agitador tipo vortex (Fisatom) por 1 min. Em seguida foi utilizada centrífuga (MiniSpin[®] plus) a 9861 g até ser observado a precipitação e separação de partículas sólidas e formação de sobrenadante (~8 min).

Posterior a centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram transferidas para microtubo de polipropileno e diluições que, variaram de 5 a 150 vezes, foram realizadas para cada amostra. A solução resultante foi diluída na proporção 9:1 (v/v) com I.S., ácido glicoxílico, na concentração final de $14,81 \text{ mg L}^{-1}$ para posterior injeção em sistema CE. O procedimento foi realizado em triplicada para cada mistura (n=15 para méis florais e n=15 para méis de melato de bracinga)

3.5 Instrumentação e condições analíticas

Os experimentos para determinação de AOA nas amostras de méis de melato de bracinga e florais foram realizados em um sistema de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), sistema de refrigeração por circulação de ar e o *software HP ChemStation*[®] (rev A.06.01) foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados.

Antes do primeiro uso no equipamento, a coluna capilar foi condicionada com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (30 min) e água ultrapurificada (30 min). O método de lavagem com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (15 min), água ultrapurificada (15 min) e solução de BGE (30 min) foi implementado para condicionar a coluna capilar no início de cada dia de trabalho, sendo que, ao final de cada dia a lavagem foi com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (15 min) e água ultrapurificada (15 min).

O condicionamento do capilar está diretamente relacionado a obtenção de dados reprodutíveis por assegurar a estabilização da superfície interna do capilar, gerando menores variações nos tempos de migração dos analitos e do EOF. A lavagem entre corridas é recomendada para evitar a adsorção de analitos e re-equilibrar a superfície interna do capilar para a próxima corrida (DELLA BETTA, 2016).

A coluna capilar utilizada nas análises foi de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensão de 60,5 cm de comprimento total (L_{tot}), sendo 52 cm comprimento efetivo (L_{eff}) e 75 μm de diâmetro interno (d.i.). Os analitos foram introduzidos na

coluna capilar com injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 3 segundos, tensão de 15 kV, com polaridade negativa (extremidade mais longa - inlet) à temperatura de 20 °C. Aplicou-se modo de detecção indireto com aquisição de sinal em 230 nm e pré-condicionamento entre corridas de 120 s.

3.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas em triplicata, no nível de confiança de 99 % e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou CV %. O tratamento dos dados foram conduzidos empregando os *softwares*: *Statistic* (versão 13.0), *Assistat* (versão 7.6), *Microsoft Excel* (versão 2010) e *OriginPro* (versão 8.0).

3.7 Desenvolvimento do método por eletroforese capilar

Na Tabela 5 são apresentadas as estruturas químicas, pK_a e mobilidades eletroforética ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) dos AOA, normalmente encontrados em méis. Tais AOA apresentam valores de pK_a similares entre si, assim, dependendo do pH do meio em que encontram-se, podem estar completamente ou parcialmente ionizados, podendo ser detectados como ânions.

Tabela 5- Estruturas químicas, valores de pK_a e mobilidades eletroforéticas dos ácidos orgânicos alifáticos.

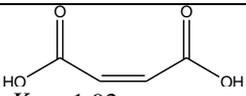
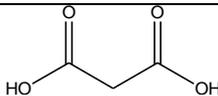
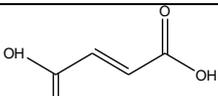
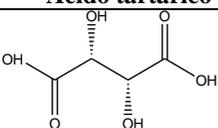
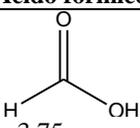
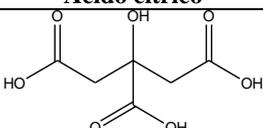
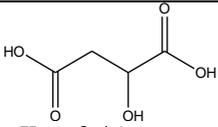
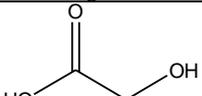
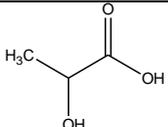
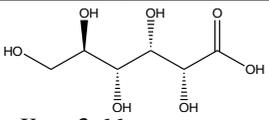
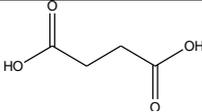
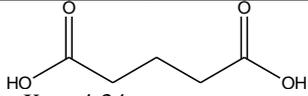
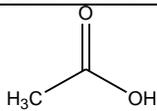
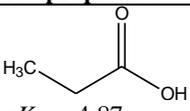
Continuação.		
Ácido maleico	Ácido malônico	Ácido fumárico
 <p>$pK_{a(-1)}$ 1,92 $\mu_{(-1)}$ 41,30</p>	 <p>$pK_{a(-1)}$ 2,85 $\mu_{(-1)}$ 40,70</p>	 <p>$pK_{a(-1)}$ 3,02 $\mu_{(-1)}$ 31,00</p>
Ácido tartárico	Ácido fórmico	Ácido cítrico
 <p>$pK_{a(-1)}$ 3,04 $\mu_{(-1)}$ 32,60</p>	 <p>$pK_{a(-1)}$ 3,75 $\mu_{(-1)}$ 56,60</p>	 <p>$pK_{a(-1)}$ 3,75 $\mu_{(-1)}$ 56,60</p>

Tabela 5 - Estruturas químicas, valores de pK_a e mobilidades eletroforéticas dos ácidos orgânicos alifáticos.

Conclusão.		
Ácido málico	Ácido glicólico	Ácido láctico
 <p>$pK_{a(-1)} 3,46$ $\mu_{(-1)} 32,60$</p>	 <p>$pK_{a(-1)} 3,89$ $\mu_{(-1)} 42,40$</p>	 <p>$pK_{a(-1)} 3,86$ $\mu_{(-1)} 36,50$</p>
Ácido glucônico	Ácido succínico	Ácido glutárico
 <p>$pK_{a(-1)} 3,66$ $\mu_{(-1)} 27,20$</p>	 <p>$pK_{a(-1)} 4,21$ $\mu_{(-1)} 33,00$</p>	 <p>$pK_{a(-1)} 4,34$ $\mu_{(-1)} 26,60$</p>
Ácido acético	Ácido propiônico	
 <p>$pK_{a(-1)} 4,76$ $\mu_{(-1)} 42,40$</p>	 <p>$pK_{a(-1)} 4,87$ $\mu_{(-1)} 37,10$</p>	

Fonte: Peakmaster® versão 5.3.

Legenda: μ , mobilidade eletroforética ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$); (-1), ácido monoprotônico.

A escolha do pH de separação pode ser realizado a partir dos valores de pK_a e mobilidades efetivas. A μ_{eff} foi obtida por meio das equações (6), (7), (8).

$$pH = -\log [H^+] \quad \text{Equação 1}$$

$$\alpha = \frac{ka}{ka + [H^+]} \quad \text{Equação 2}$$

$$\mu_{eff} = \alpha \times \mu_{el} \quad \text{Equação 3}$$

Onde μ_{el} corresponde a mobilidade eletroforética e α o grau de ionização de cada molécula.

3.8 Validação analítica intralaboratorial

Validação intralaboratorial representa 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 (DE SOUZA, 2007).

A fim de garantir a confiabilidade do método desenvolvido para determinação de AOA em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e florais, os parâmetros de validação analítica: linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados com base em recomendações da Eurachem (EURACHEM, 2014) e a conformidade do sistema, os LOD e LOQ foram avaliados conforme descrito por Faria; Souza; Oliveira, (2008).

3.8.1 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi obtida por meio do CV da média obtida de dez injeções consecutivas, utilizando uma mistura dos padrões (concentração de nível 7) da curva de calibração em solução aquosa. A área corrigida (área_{analito}/área_{I.S.}) e o tempo de migração corrigido (tempo_{analito}/tempo_{I.S.}) foram os parâmetros avaliados.

3.8.2 Linearidade

A faixa linear do método proposto foi avaliada por meio da construção de curvas de calibração em solução aquosa para todos os AOA. As curvas foram preparadas em triplicata em sete níveis de concentração (n=21) (Tabela 3 da seção 3.2) e injetadas no equipamento de CE.

Os parâmetros da curva de calibração em solução aquosa foram determinados a partir do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Então, após a aquisição dos dados foi realizada regressão linear e os resíduos da regressão foram analisados graficamente para verificar a presença de tendências e possíveis valores discrepantes (*outliers*). Os possíveis *outliers* foram submetidos ao teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) ($p < 0,01$) para verificação, conforme Equação 1.

$$\text{Grubbs} = \frac{\text{valor suspeito} - \text{media}}{\text{desvio padrão}} \quad \text{Equação 4}$$

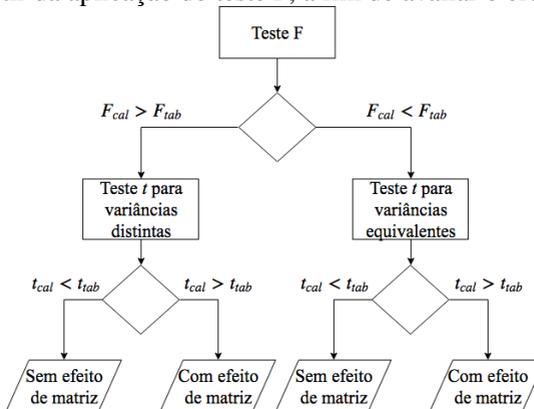
Os resíduos da regressão também foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), homoscedasticidade pelo teste de Cochran (COCHRAN, 1941), independência pelo teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951) e ajuste ao modelo linear empregando o teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989), todos com nível de confiança de 99 %.

3.8.3 Efeito de matriz

O estudo do efeito de matriz foi realizado a partir da construção de curvas de calibração, pelo método de adição de padrão, utilizando a amostra FUP1 (mel floral - Urupema) e a amostra MUP2 (mel de melato de bracatinga - Urupema). As curvas de calibração das matrizes também foram preparadas em triplicata, em sete níveis de diferentes concentrações ($n=21$), as quais, correspondem a Tabela 3 da seção 3.2. A linearidade também foi avaliada nas curvas de calibração em matrizes de méis florais e de méis de melato de bracatinga, conforme descrito na seção 3.8.2.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio da comparação dos coeficientes angulares da curva de calibração em solução aquosa e dos coeficientes angulares das curvas de calibração de ambas as classes de méis. A comparação foi avaliada estatisticamente por meio da aplicação do teste *t-Student*. Porém, para definir o tipo de teste *t* a ser empregado, foi empregado o teste *F*, conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4- Representação esquemática para verificar qual teste *t-Student* utilizar a partir da aplicação do teste *F*, a fim de avaliar o efeito de matriz.



Fonte: Adaptado de Della Betta (2016).

Se F calculado for maior que F tabelado, há diferença entre as variâncias sendo indicado aplicação do teste t para variâncias distintas, caso contrário, recomenda-se, aplicação do teste t para variâncias equivalentes. Por conseguinte, se t calculado for menor que t tabelado não há diferença entre as variâncias e consequentemente não ocorre efeito de matriz (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

3.8.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada experimentalmente por meio da injeção de uma mistura dos AOA, dos possíveis interferentes, ácidos oxálico e aspártico e, I.S. na concentração final de 14,81 mg L⁻¹. A concentração de cada AOA e dos interferentes na solução utilizada é demonstrada na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração dos ácidos orgânicos alifáticos e dos interferentes utilizados para verificação da seletividade do método.

Analitos	Concentração (mg L ⁻¹)	Analitos	Concentração (mg L ⁻¹)
Ácido maleico	24,18	Ácido láctico	18,95
Ácido malônico	21,68	Ácido glucônico	45,45
Ácido fumárico	24,18	Ácido succínico	24,60
Ácido tartárico	31,27	Ácido glutárico	27,53
Ácido fórmico	9,46	Ácido acético	12,51
Ácido cítrico	40,03	Ácido propiônico	15,59
Ácido málico	27,94	Ácido oxálico*	18,73
Ácido glicólico	15,67	Ácido aspártico*	27,73

Legenda: *Compostos interferentes.

Fonte: Próprio autor.

As condições experimentais para separação dos analitos foi realizada conforme descrito na seção 3.5.

3.8.5 Precisão

A precisão intra-ensaio foi avaliada a partir de três injeções da mistura da solução dos padrões do analitos em três diferentes níveis de concentrações (níveis 4, 5 e 7 da Tabela 3, seção 3.2) e I.S. no mesmo dia. A precisão inter-ensaio foi determinada da mesma maneira que a precisão intra-ensaio porém em três dias diferentes. Os resultados foram

expressos em porcentagem (%) de CV para os parâmetros: área corrigida (área_{analito}/área_{I.S.}) e tempo de migração corrigido (tempo_{analito}/tempo_{I.S.}).

3.8.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação aparente das amostras FUP1 e MUP2 (mel floral e de melato de bracatinga, respectivamente), em três níveis de concentração: nível de concentração 2, nível de concentração 4 e nível de concentração 6. Para os cálculos de recuperação aparente das amostras FUP1 e MUP2, foi utilizado a equação 2.

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C_{\text{amostra fortificada}} - C_{\text{amostra não fortificada}}}{C_{\text{adicionada na fortificação}}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

3.8.7 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ do método foram calculados, conforme equação 3 e 4, respectivamente (FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008), em curva de calibração em solução aquosa e em curva de calibração da amostra MUP2. Ambas foram avaliadas em triplicata e utilizando o nível de concentração 2.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b \times C_s}{H_{\text{max}} - H_{\text{min}}} \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b \times C_s}{H_{\text{max}} - H_{\text{min}}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde S_b significa o desvio padrão da linha de base, C_s a concentração do analito, H_{max} a altura máxima do pico e H_{min} o nível de linha de base do pico.

3.8.8 Robustez

O desempenho do método analítico poderia ser influenciado pela variação de alguns parâmetros analíticos. Dessa maneira, por meio de um delineamento experimental (YOUNG; STEINER, 1975), sete parâmetros foram escolhidos para avaliar a robustez, entre eles, tensão;

pH do BGE; temperatura da separação; pressão de injeção; comprimento de onda; tempo de lavagem entre corridas e tempo de injeção. Tais parâmetros foram avaliados em condições nominais e condições alteradas em pequenas variações, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros analíticos e condições nominais e alteradas.

	Parâmetros analíticos	Condição nominal	Condição alterada
A/a	Tensão (kV)	15 (A)	15,5 (a)
B/b	pH	3,3 (B)	3,4 (b)
C/c	Temperatura (°C)	20 (C)	21 (c)
D/d	Pressão (mbar)	50 (D)	49 (d)
E/e	Comprimento de onda (nm)	230 (E)	225 (e)
F/f	Lavagem entre corridas (s)	120 (F)	117 (f)
G/g	Tempo de injeção (s)	3 (G)	4 (g)

Fonte: Adaptado de Youden e Steiner (1975).

As condições nominais e alteradas foram combinadas em oito experimentos, conforme demonstrado na Tabela 8, a fim de avaliar a influência de cada parâmetro na concentração; área e tempo de migração corrigidos; simetria e resolução para cada AOA na curva de calibração em solução aquosa (nível de concentração 5) e também em curva de calibração da amostra MUP2 (nível de concentração 3) .

Tabela 8- Delineamento experimental aplicado no teste de Youden.

Parâmetros analíticos	Fatorial – número de experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão (kV)	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	c
Pressão (mbar)	D	D	d	D	d	d	D	D
Comprimento de onda (nm)	E	E	E	E	e	E	E	E
Lavagem entre corridas (s)	F	F	f	F	F	f	F	F
Tempo de injeção (s)	G	G	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Legenda: Letras maiúsculas indicam as condições sem alteração (nominais) e as letras minúsculas indicam as condições alteradas.

Fonte: Adaptado de Youden e Steiner (1975).

Para estimar a robustez do método proposto e avaliar o efeito de cada parâmetro, um exemplo do cálculo para o parâmetro tensão é mostrado na Equação 5.

$$A - a = \frac{(s+t+u+v)}{4} - \frac{(w+x+y+z)}{4} \quad \text{Equação 8}$$

4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

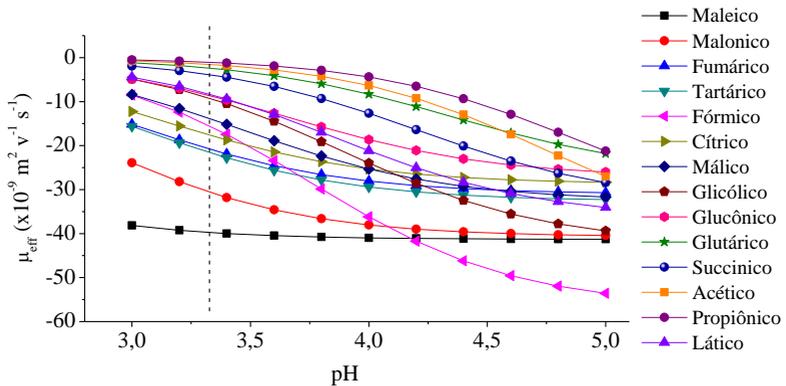
Após a validação analítica, o método proposto foi aplicado à determinação de cinco amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) (n=5) e cinco amostras de méis florais (n=5), ambas oriundas de Lages, São Joaquim, Urubici, Urupema e Bom Retiro. Os resultados foram expressos como média (mg 100 g⁻¹) ± desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método por eletroforese capilar

A μ_{eff} foi obtida conforme descrito na seção 3.7 e, a partir disso, foi contruída curva de μ_{eff} dos analitos de interesse *versus* pH, por meio do *software* OriginPro, representadas na Figura 5.

Figura 5- Curva de mobilidade efetiva dos ácidos orgânicos alifáticos *versus* pH para avaliação da escolha do pH do eletrólito de corrida.



As curvas de μ_{eff} dos analitos auxiliam na escolha do pH mais propício para a separação ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos analitos são maximizadas (TAVARES, 1995), contribuindo para que não ocorra a co-migração dos analitos. A partir da faixa de pH investigada (Figura 5), foi observado que entre pH 3,0 e 3,5 ocorreu as maiores diferenças nas mobilidades dos AOA, provavelmente devido a ionização da maioria dos ácidos, visto que, esses compostos possuem pK_a que variam de 1,92 a 4,87. Contudo, o pH do BGE foi definido em 3,3.

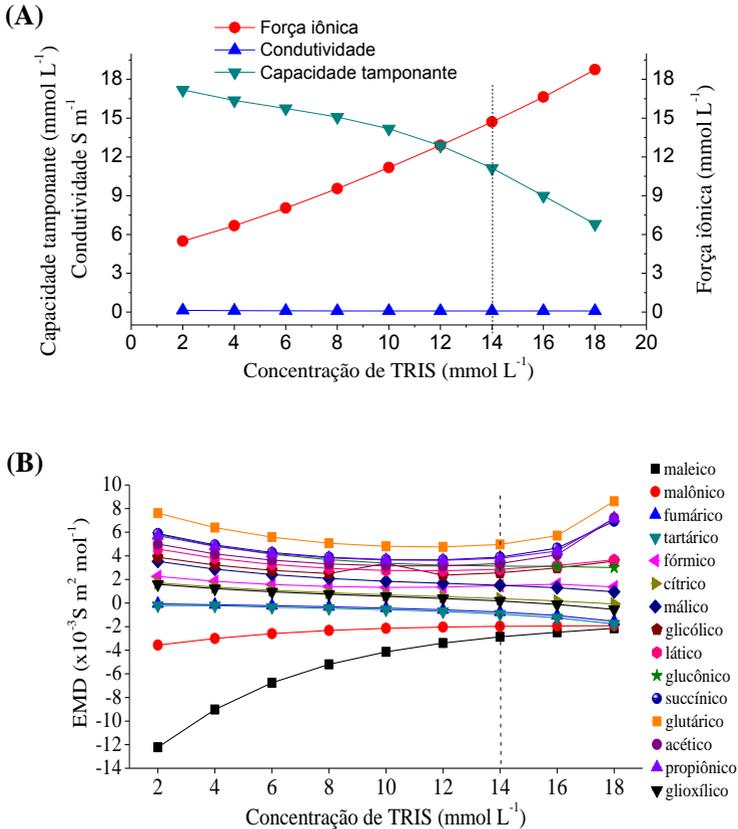
A separação foi simulada no *software* Peakmaster® considerando o modo de detecção indireto, visto que, os AOA apresentam baixa absorvidade molar na região do UV-Vis. Outra característica que indica um BGE adequado para separação é a escolha de um co-íon com mesma carga e mobilidade próxima a mobilidade média dos analitos para minimizar uma das causas de alargamento das zonas, a dispersão por eletromigração (EMD, do inglês *Electromigration Dispersion*). Dessa

maneira, a partir do banco de dados do Peakmaster®, o ácido ftálico na concentração de 20 mmol L^{-1} ($\mu_{(-1)} 28,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $\text{p}K_{\text{a}(-1)} 2,95$) foi o co-íon escolhido para compor o BGE, pois apresentou tais características e também por absorver na região do UV-Vis.

O TRIS ($\text{p}K_{\text{a}} 8,08$) foi utilizado como contra-íon, ou seja, constituinte de carga oposta do analito, com a função de ajustar o pH utilizado na separação (pH do BGE 3,3). Para a escolha da concentração do contra-íon que iria compor o BGE foram realizadas simulações por meio do *software* Peakmaster®, fixando a concentração de ácido ftálico em 20 mmol L^{-1} e variando a concentração de TRIS de 2 a 16 mmol L^{-1} (intervalos de 2 mmol L^{-1}). Além da escolha da concentração de TRIS, na Figura 6 são representados os valores de EMD, força iônica, condutividade e capacidade tamponante em cada condição avaliada.

A diferença de condutividade entre a zona do analito e do BGE podem implicar em variações no campo elétrico e também se ocorrer uma diferença significativa de mobilidade dos analitos que compõem o BGE, ambos, podem resultar em cauda ou deformação frontal, reduzindo a eficiência da separação (WILLIAMS et al., 1998). Contudo, a EMD é uma das causas de alargamento das zonas que ocorre devido a uma diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona do analito e do BGE, sendo considerado EMD ideal a mais próxima possível de zero para obtenção de bandas simétricas.

Figura 6- Curva contruída utilizando o Peakmaster® para otimização do BGE. (A) Parâmetros do BGE *versus* concentração de TRIS e (B) EMD *versus* concentração de TRIS.



A partir da Figura 6 (A), foi definida a concentração de TRIS em 14 mmol L^{-1} pois nessa condição foi observada baixa condutividade ($0,087 \text{ S cm}^{-1}$), reduzida força iônica ($17,72 \text{ mmol L}^{-1}$) e capacidade tamponante ($11,13 \text{ mmol L}^{-1}$) considerada adequada para separação dos ânions. A partir da Figura 6 (B) foi observado que não era possível obter uma condição ideal de EMD ($\text{EDM}=0$) porém, na concentração de 14 mmol L^{-1} de TRIS os ácidos maleico e malônico apresentavam menor EMD e aproximavam-se dos demais analitos.

A concentração de 16 mmol L⁻¹ não foi utilizada por ser observado um aumento da força iônica e diminuição da capacidade tamponante. O aumento da força iônica possibilita o surgimento do efeito Joule, devido ao maior fluxo de corrente dentro do capilar (LANDERS, 2008). Conseqüentemente, o aumento da corrente pode levar a depleção do BGE por meio da eletrólise, sendo necessário uma reposição mais frequente do BGE. Com relação a capacidade tamponante, sugere-se que, em separações eletroforéticas, esse parâmetro seja superior a 10 mmol L⁻¹ para assegurar que o sistema resista a pequenas perturbações que possam ocorrer durante as análises.

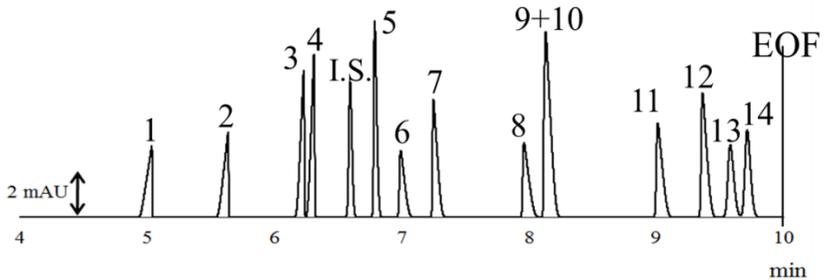
A utilização de I.S. minimiza possíveis erros de injeção no equipamento, devido aos pequenos volumes introduzidos no capilar. É necessário que o I.S. possua semelhança estrutural e mobilidade próxima aos analitos de estudo, não apresente absorção na região do UV-Vis e não esteja presente nas amostras analisadas. O analito que apresentou todas essas características foi o ácido glioxílico ($\mu_{(-1)}$ 39,6 x 10⁻⁹ m² v⁻¹ s⁻¹; pK_{a(-1)} 3,337). Esse ácido foi utilizado na concentração final de 14,81 mg L⁻¹.

O *software* Peakmaster® foi de fundamental importância também na determinação da tensão que, por meio da simulação, definiu-se a tensão em 15 kV (polaridade negativa) a qual gerou baixa corrente elétrica durante as análises (12 µA) e extinguiu interferências indesejáveis como a co-migração e deformação de picos que poderiam ser provenientes do efeito Joule.

Em pH abaixo de 4 a mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) normal é praticamente desprezível (abaixo de 10x10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹) porém, com a inversão do EOF a mobilidade observada será maior, visto que, ocorre a soma da mobilidade dos analitos, os quais chegarão ao detector em menor tempo. Para inversão do EOF e promover a migração de todos os ânions até o detector, foi utilizado o surfactante catiônico CTAB na concentração de 1,6 mmol L⁻¹.

Após seguir diversos critérios para obter um BGE com adequado desempenho na separação dos AOA, foi realizada uma simulação por meio do *software* Peakmaster®. O eletroferograma da separação dos AOA está apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da simulação no Peakmaster®.



Legenda: 1- ácido maleico; 2- ácido malônico; 3- ácido tartárico; 4- ácido fumárico; I.S.- ácido glioxílico; 5- ácido cítrico; 6- ácido fórmico; 7- ácido málico; 8- ácido glicólico; 9+10- ácidos láctico e glucônico; 11- ácido succínico; 12- ácido glutárico; 13- ácido acético e 14- ácido propiônico.

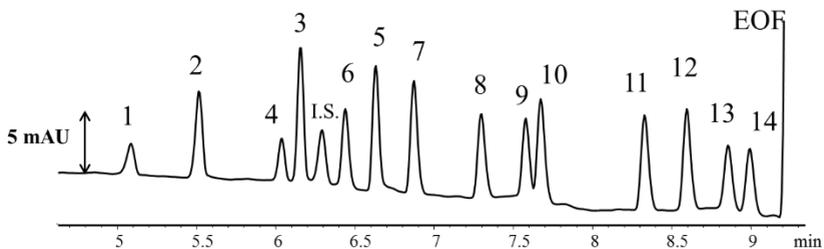
A partir da Figura 7 foi observado que, apesar de seguir diversos critérios para a escolha adequada dos componentes do BGE e as condições de separação não foram suficientes para promover a separação, principalmente dos ácidos láctico e glucônico.

Nesse contexto, alterações das propriedades físico-químicas do BGE vem sendo utilizadas na separação de compostos por CE, por meio da utilização de aditivos ao BGE, tais como, solventes orgânicos (metanol ou acetonitrila), polímeros de celulose, metais de transição, aminas e/ou sais (cálcio, magnésio ou cobre). Os aditivos podem modificar propriedades químicas do BGE, alterar as mobilidades dos analitos e reduzir interações de algumas espécies com a parede do capilar (LANDERS, 2008; MATO et al., 2006a; TAVARES, 1995).

Especialmente os sais inorgânicos, podem reduzir o EOF devido a complexação do sal com a parede interna do capilar, reduzindo o número de grupos silanoatos disponíveis (TAVARES, 1997), ou ainda, os sais inorgânicos podem complexar-se seletivamente com analitos, alterando a mobilidade desses compostos (MATO et al., 2006a). Nesse estudo, foi utilizado o cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração de 1 mmol L^{-1} , que promoveu uma melhora significativa na separação, principalmente dos ácidos láctico e glucônico, os quais, apresentavam co-migração antes da adição do CaCl_2 ao BGE. Devido o CaCl_2 não estar presente no banco de dados do Peakmaster®, a separação eletroforética dos AOA utilizando o

CaCl_2 (1 mmol L⁻¹) foi avaliada por meio da CZE e o resultado está demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da CZE.



Legenda: 1- ácido maleico; 2- ácido malônico; 3- ácido fumárico; 4- ácido tartárico; I.S.- ácido glioxílico; 5- ácido fórmico; 6- ácido cítrico; 6- ácido málico; 8- ácido glicólico; 9+10- ácidos láctico e glucônico; 11- ácido succínico; 12- ácido glutárico; 13- ácido acético e 14 ácido propiônico.

Foi possível observar (Figura 8) que ocorreu total separação dos ácidos láctico e glucônico e inversão na ordem de migração dos ácidos: fumárico, tartárico, fórmico e cítrico quando comparado ao eletroferograma da Figura 7. Ambas as mudanças ocorreram, provavelmente, devido a complexação seletiva do Ca^{2+} à esses ácidos, retardando ou aumentando a velocidade de separação por consequência da alteração da mobilidade desses compostos. Além disso, o tempo total de análise obtido experimentalmente foi levemente inferior comparada com a simulação pelo Peakmaster®.

O controle de temperatura do capilar é uma prática importante a ser seguida para assegurar a repetitividade das separações (LANDERS, 2008). Nesse contexto, a temperatura foi definida em 20 °C, a qual garantiu a separação de todos os AOA.

5.2 Conformidade do Sistema

Os resultados para a conformidade do sistema foram expressos como valores de CV % e podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultados do teste de conformidade do sistema para aos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.

AOA	Tempo de migração corrigido (CV %)	Área corrigida (CV %)	AOA	Tempo de migração corrigido (CV %)	Área corrigida (CV %)
Maleico	0,05	1,51	Glicólico	0,05	2,33
Malônico	0,04	1,72	Lático	0,07	2,38
Fumárico	0,01	1,69	Glucônico	0,08	1,16
Tartárico	0,01	1,90	Succínico	0,11	1,82
Fórmico	0,01	2,65	Glutárico	0,13	1,91
Cítrico	0,03	2,04	Acético	0,14	2,14
Málico	0,04	2,24	Propiônico	0,15	2,01

Legenda: Tempo de migração corrigido (tempo_{analito}/tempo_{I.S.}); Área corrigida (área_{analito}/área_{I.S.}).

$n = 10$;

Fonte: Próprio autor.

Os resultados de CV % observados na Tabela 9 para o parâmetro tempo de migração corrigido ($t_{migração}$) variaram de 0,01 % para os ácidos fumárico, tartárico e fórmico a 0,15 % para os ácidos maleico e glicólico. Para o parâmetro área corrigida os CV variaram de 1,16 % para o ácido glucônico a 2,65 % para o ácido fórmico. Os baixos coeficientes de variação demonstram que o sistema instrumental empregado para as análises encontra-se adequado e pode ser utilizado no procedimento de validação.

5.3 Linearidade

A partir dos resultados obtidos experimentalmente foram construídos gráficos de regressão linear (concentração *versus* área corrigida) para cada AOA. Todas as curvas de calibração apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior ou igual a 0,99. Posteriormente foram construídos gráficos dos resíduos da regressão linear (Figura 9) para verificar a presença de possíveis valores discrepantes. Para confirmação, foram submetidos ao teste de Grubbs (GRUBBS, 1969).

Figura 9- Gráficos dos resíduos da regressão linear para os ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.

Continuação.

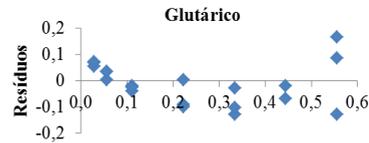
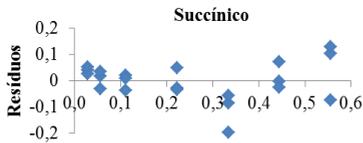
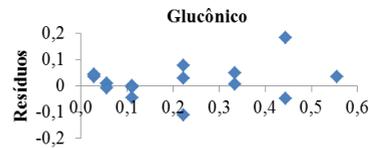
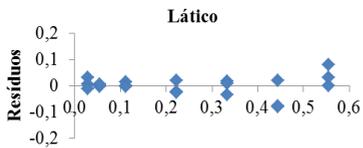
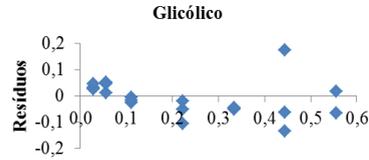
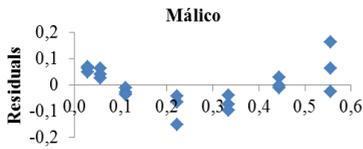
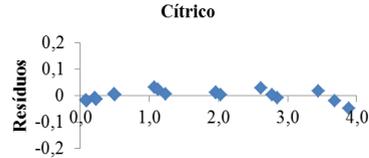
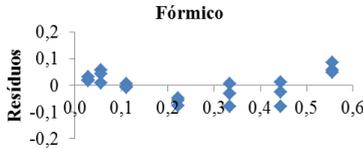
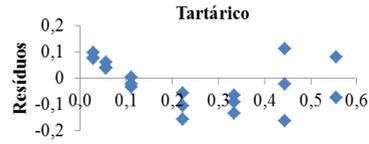
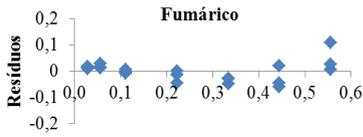
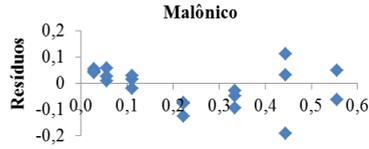
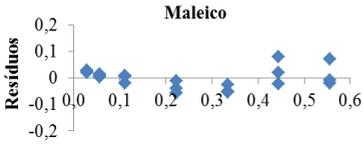
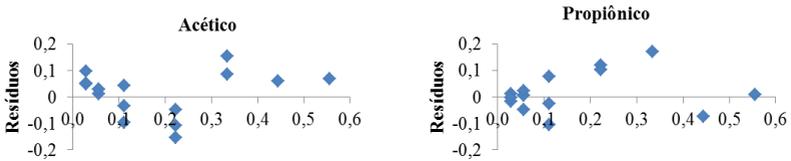


Figura 9- Gráficos dos resíduos da regressão linear para os ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.



Conclusão.

Fonte: Próprio autor.

Após aplicação do teste de *Grubbs*, conforme os resultados demonstrado na Figura 9, não foram confirmados valores discrepantes e dessa maneira, nenhum resultado foi removido.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados de normalidade para os resíduos da curva de calibração em solução aquosa, avaliados pelo teste de *Shapiro-Wilk*, por meio do *software* de análise estatística *Statistic*.

Tabela 10- Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.

AOA	$W_{\text{calculado}}$	AOA	$W_{\text{calculado}}$
Maleico	0,95	Glicólico	0,91
Malônico	0,95	Lático	0,92
Fumárico	0,90	Glucônico	0,88
Tartárico	0,92	Succínico	0,96
Fórmico	0,96	Glutárico	0,95
Cítrico	0,96	Acético	0,96
Málico	0,97	Propiônico	0,96

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos e $p < 0,01$ o valor de W tabelado é de 0,87. A partir dos resultados demonstrados na Tabela 10, foi observado que W calculado apresentou resultados maiores que W tabelado, ou seja, a hipótese nula (H_0) não foi rejeitada, indicando que os resíduos da regressão são provenientes de uma distribuição normal. A hipótese nula somente será rejeitada quando o W calculado apresentar resultados menores que os valores críticos estabelecidos, nesse caso, será aceita a hipótese alternativa (H_1) a qual indica que os dados não provém de uma distribuição normal.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados da homoscedasticidade para os resíduos da curva de calibração em solução aquosa a qual, foi avaliada pelo teste de *Cochran* por meio do *software* de análise de variância, *Assistat*.

Tabela 11- Resultados do teste de *Cochran* para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.

AOA	$C_{\text{calculado}}$	AOA	$C_{\text{calculado}}$
Maleico	0,42	Glicólico	0,59
Malônico	0,48	Lático	0,47
Fumárico	0,53	Glucônico	0,54
Tartárico	0,65	Succínico	0,49
Fórmico	0,39	Glutárico	0,44
Cítrico	0,65	Acético	0,37
Málico	0,62	Propiônico	0,29

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos o valor de C tabelado é de 0,66. A partir dos resultados demonstrados na Tabela 11, foi observado que C calculado foi menor que C tabelado. Nesse caso, a hipótese nula foi aceita, ou seja, H_0 não foi rejeitado, indicando que a variância dos resíduos da regressão não diferem entre si e representam resultados de homoscedasticidade.

A avaliação da premissa independência foi avaliada pelo teste de *Durbin-Watson* e os resultados foram gerados pelo *software Statistic*. Tais resultados foram interpretados por meio do uso de valores críticos (Quadro 1) de *Durbin-Watson* (DURBIN; WATSON, 1951).

Quadro 1- Valores críticos de *Durbin-Watson*.

Se $0 \leq dw < d_L \Rightarrow$ rejeitamos H_0 (dependência);
Se $d_L \leq dw < d_U \Rightarrow$ o teste é inconclusivo;
Se $d_U < dw < 4 - d_U \Rightarrow$ não rejeitamos H_0 (independência)
Se $4 - d_U \leq dw \leq 4 - d_L \Rightarrow$ o teste é inconclusivo
Se $4 - d_L < dw < 4 \Rightarrow$ rejeitamos H_0 (dependência)

A partir do Quadro 1 foi observado que, para cada conjunto de dados, há dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Se o valor de dw estiver entre estes limites, o teste é inconclusivo. Valores de $dw < d_L$ indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula, enquanto valores de $dw > d_L$ indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula (SOUZA, 2007).

Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos após a aplicação do teste de *Durbin-Watson* e interpretação de valores críticos (Quadro 1). Para 21 pontos e $p < 0,01$ os valores tabelados para d_L e d_U são 0,97 e 1,16, respectivamente (DURBIN; WATSON, 1951).

Tabela 12- Resultados de teste de *Durbin-Watson* para avaliação da independência dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.

AOA	dw	Resultado	AOA	Dw	Resultado
Maleico	1,53	Independência	Glicólico	2,21	Independência
Malonico	1,85	Independência	Lático	1,44	Independência
Fumárico	1,43	Independência	Glucônico	2,60	Independência
Tartárico	1,37	Independência	Succínico	1,19	Independência
Fórmico	1,22	Independência	Glutárico	1,81	Independência
Cítrico	1,22	Independência	Acético	2,54	Independência
Málico	0,94	Dependência	Propiônico	2,93	Inconclusivo

Fonte: Próprio autor.

Foi observado (Tabela 12) que, com exceção dos ácidos málico e propiônico, todos os analitos apresentaram independência. O resultado obtido para o ácido málico, provém dos valores de dw menores à d_L ($dw < d_L$), indicando a autocorrelação dos resíduos, ou seja, a dependência. Para o ácido propiônico o valor de dw ficou entre os dois limites críticos (d_L e d_U), dessa forma, o resultado obtido foi inconclusivo.

Contudo, por meio da aplicação do teste F de Fischer-Snedecor, foi verificado o ajuste ao modelo linear dos dados. Os resultados estão representados na Tabela 13.

Tabela 13- Resultados do teste F para avaliação do ajuste ao modelo linear dos ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.

AOA	$F_{\text{calculado}}$	AOA	$F_{\text{calculado}}$
Maleico	2.347,2	Glicólico	3.145,8
Malonico	2.095,3	Lático	9.822,7

Continuação.

Tabela 13- Resultados do teste F para avaliação do ajuste ao modelo linear dos ácidos orgânicos alifáticos em curva aquosa.

Conclusão.

AOA	F calculado	AOA	F calculado
Fumárico	2.868,5	Glucônico	1.517,7
Tartárico	2.950,5	Succínico	6.190,7
Fórmico	5.175,6	Glutárico	3.421,3
Cítrico	1.967,1	Acético	719,04
Málico	6.234,2	Propiônico	593,64

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos o valor de F tabelado é de 1,19. Contudo, os resultados apresentados na Tabela 13 demonstraram que não ocorreu a falta de ajuste ao modelo linear, visto que, F calculado foi maior que F tabelado. A partir da verificação de todas as premissas concluiu-se que o modelo testado para as curvas aquosas de todos os analitos na faixa de trabalho estudada foi linear.

5.4 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizado conforme descrito na seção 3.8.3. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos após a regressão linear das curvas de calibração em matriz (floral e melato) foram maiores ou iguais a 0,99. Os gráficos dos resíduos da regressão para a matriz de mel floral e matriz de mel de melato estão representados nas Figura 10 e Figura 11, respectivamente.

Figura 10- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva de matriz de mel floral.

Continuação.

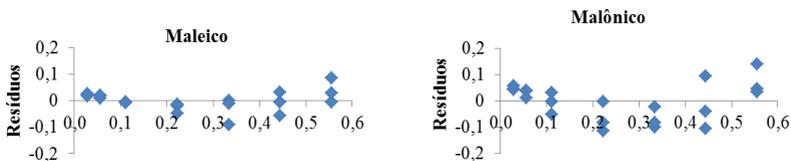
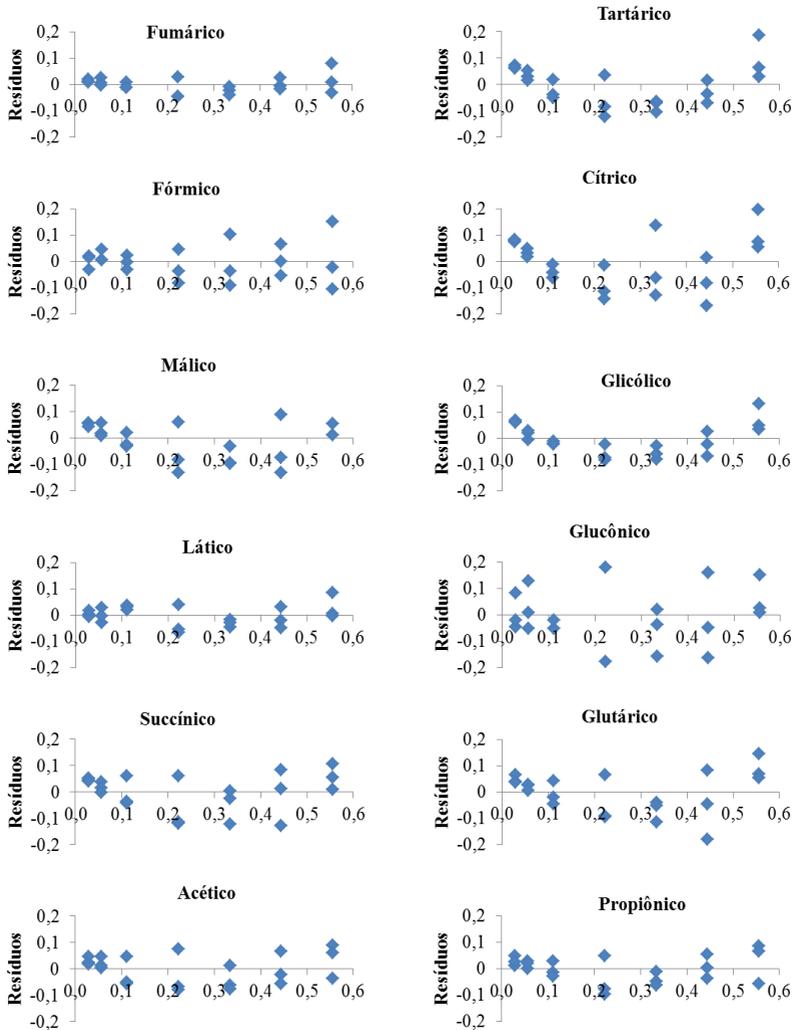


Figura 10- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva de matriz de mel floral.

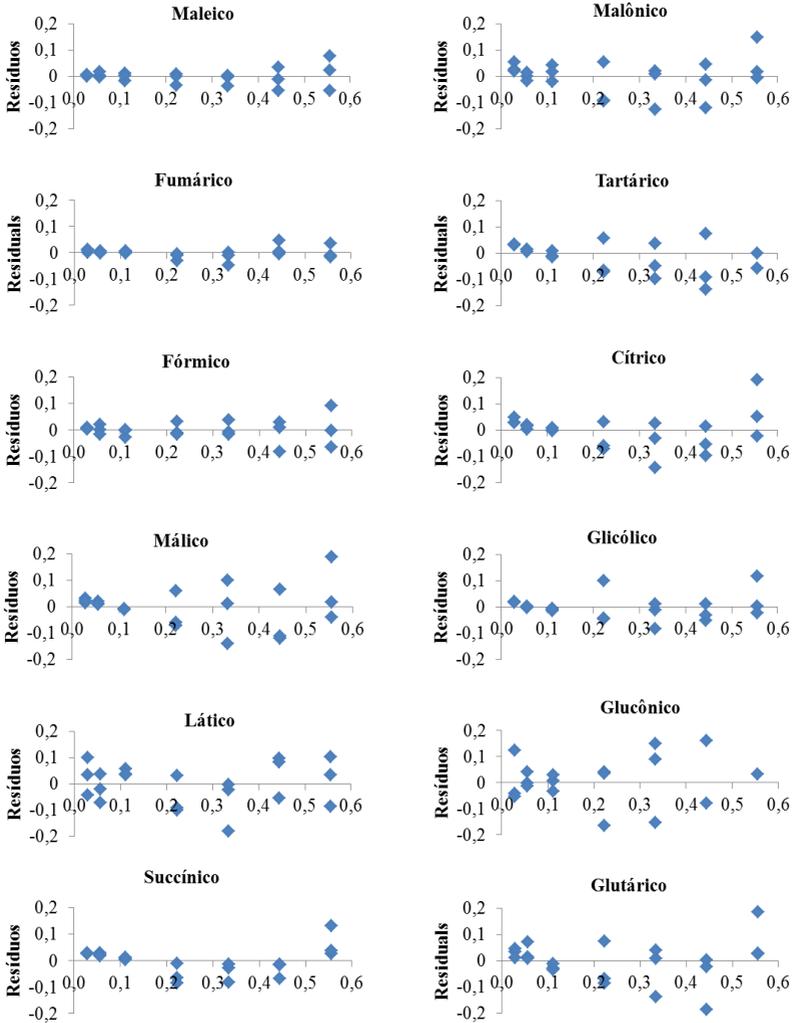
Conclusão.



Fonte: Próprio autor.

Figura 11- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva da matriz de mel de melato.

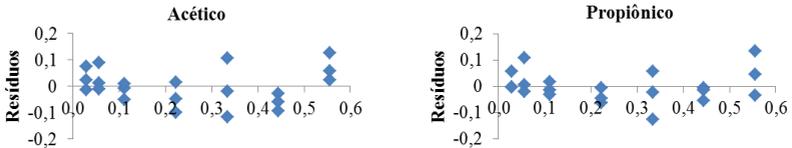
Continuação.



Fonte: Próprio autor

Figura 11- Gráficos de resíduos para avaliar a regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos na curva da matriz de mel de melato.

Conclusão.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados obtidos e demonstrados nas Figuras 10 e 11, não foram identificados valores discrepantes e dessa forma, nenhum resultado foi removido.

O teste de normalidade dos resíduos das curvas de calibração em matriz (floral e melato) foram avaliadas pelo teste de *Shapiro-Wilk* e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracatinga.

AOA	Amostra	$W_{\text{calculado}}$	AOA	Amostra	$W_{\text{calculado}}$
Maleico	Floral	0,93	Glicólico	Floral	0,96
	Melato	0,92		Melato	0,89
Malônico	Floral	0,95	Lático	Floral	0,98
	Melato	0,91		Melato	0,94
Fumárico	Floral	0,94	Glucônico	Floral	0,95
	Melato	0,93		Melato	0,97
Tartárico	Floral	0,95	Succínico	Floral	0,90
	Melato	0,88		Melato	0,90
Fórmico	Floral	0,97	Glutárico	Floral	0,96
	Melato	0,92		Melato	0,94
Cítrico	Floral	0,98	Acético	Floral	0,92
	Melato	0,91		Melato	0,98
Málico	Floral	0,94	Propiônico	Floral	0,98
	Melato	0,95		Melato	0,95

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos e $p < 0,01$ o valor de W tabelado é de 0,87. A partir dos resultados representados na Tabela 14, foi observado que W calculado apresentou resultados maiores que W tabelado, ou seja, a hipótese nula (H_0) não foi rejeitada, indicando que os resíduos da regressão são provenientes de uma distribuição normal.

O teste de *Cochran* foi utilizado para avaliar a homoscedasticidade dos resíduos e os resultados obtidos por meio do *software* de análise de variância, *Assistat*, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15- Resultados do teste de *Cochran* para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracinga.

AOA	Amostra	$C_{\text{calculado}}$	AOA	Amostra	$C_{\text{calculado}}$
Maleico	Floral	0,36	Glicólico	Floral	0,39
	Melato	0,58		Melato	0,43
Malônico	Floral	0,50	Lático	Floral	0,39
	Melato	0,24		Melato	0,33
Fumárico	Floral	0,54	Glucônico	Floral	0,39
	Melato	0,34		Melato	0,46
Tartárico	Floral	0,39	Succínico	Floral	0,36
	Melato	0,57		Melato	0,46
Fórmico	Floral	0,46	Glutárico	Floral	0,54
	Melato	0,53		Melato	0,28
Cítrico	Floral	0,49	Acético	Floral	0,33
	Melato	0,47		Melato	0,49
Málico	Floral	0,36	Propiônico	Floral	0,38
	Melato	0,33		Melato	0,36

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos o valor de C tabelado é de 0,66. A partir dos resultados representados na Tabela 15, foi observado que C calculado foi menor que C tabelado, ou seja, a hipótese nula foi aceita, (H_0 não foi rejeitado), indicando que a variância dos resíduos da regressão são homoscedásticos.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados de independência dos resíduos, os quais, foram obtidos após a aplicação do teste de *Durbin-Watson* e interpretação de valores críticos (Quadro 1).

Tabela 16- Resultados de teste de *Durbin-Watson* para avaliação da independência dos resíduos da regressão da curva de calibração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracinga.

AOA	Amostra	Dw	Resultado	AOA	Amostra	dw	Resultado
Maleico	Floral	0,94	DP	Glicólico	Floral	0,52	DP
	Melato	2,49	ID		Melato	2,19	ID
Malônico	Floral	0,80	DP	Lático	Floral	1,25	ID
	Melato	2,05	ID		Melato	1,93	ID
Fumárico	Floral	1,52	ID	Glucônico	Floral	2,12	ID
	Melato	2,09	ID		Melato	2,91	IC
Tartárico	Floral	0,52	DP	Succínico	Floral	1,68	ID
	Melato	2,34	ID		Melato	1,43	ID
Fórmico	Floral	2,90	IC	Glutárico	Floral	1,27	ID
	Melato	2,73	ID		Melato	1,95	ID
Cítrico	Floral	1,23	ID	Acético	Floral	2,32	ID
	Melato	1,84	ID		Melato	1,94	ID
Málico	Floral	0,91	DP	Propiônico	Floral	1,79	ID
	Melato	2,57	ID		Melato	2,15	ID

Legenda: DP- dependência; ID- independência; IC- inconclusivo

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos e $p < 0,01$ os valores tabelados para d_L e d_U são 0,97 e 1,16, respectivamente (DURBIN; WATSON, 1951). A partir da Tabela 16, foi observado que para a curva de calibração de mel floral os AOAs: fumárico, cítrico, lático, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiônico apresentaram independência dos resíduos, devido aos valores de $dw > d_L$. Para os AOAs: maleico, malônico, tartárico, málico e glicólico os resíduos apresentaram dependência, uma vez que, valores de $dw < d_L$ e o ácido fórmico demonstrou resultando inconclusivo devido ao valor de dw estar entre os limites (superior e inferior). Os resultados obtidos (Tabela 16) para a curva de calibração de mel de melato de bracinga, indicaram que todos os AOAs apresentaram independência dos resíduos, com exceção do ácido glucônico que apresentou resultado inconclusivo.

Contudo, por meio da aplicação do teste F de Fischer-Snedecor, foi verificado o ajuste ao modelo linear dos dados e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17- Resultados do teste F para avaliação do ajuste ao modelo linear dos ácidos orgânicos alifáticos em solução das matrizes de méis floral e de melato de bracinga.

AOA	Amostra	$F_{\text{calculado}}$	AOA	Amostra	$F_{\text{calculado}}$
Maleico	Floral	3.504,9	Glicólico	Floral	6191,5
	Melato	4.231,8		Melato	7693,1
Malônico	Floral	5.328,6	Lático	Floral	10902,4
	Melato	2.161,1		Melato	1851,4
Fumárico	Floral	6.773,3	Glucônico	Floral	1.494,2
	Melato	5.443,1		Melato	490,4
Tartárico	Floral	6.738,1	Succínico	Floral	5.692,7
	Melato	4.696,9		Melato	8.509,0
Fórmico	Floral	2.474,3	Glutárico	Floral	5.155,3
	Melato	4.848,5		Melato	3.867,8
Cítrico	Floral	4.542,3	Acético	Floral	5.360,3
	Melato	7.644,3		Melato	2.733,2
Málico	Floral	5.009,5	Propiônico	Floral	7.666,4
	Melato	4.676,1		Melato	3.914,5

Fonte: Próprio autor.

Para 21 pontos o valor de F tabelado é de 1,19. Contudo, os resultados apresentados na Tabela 17 demonstraram que não ocorreu a falta de ajuste ao modelo linear, visto que, F calculado foi maior que F tabelado. Com as premissas confirmadas concluiu-se que, o modelo testado para as curvas de calibração de mel floral e de mel de melato de bracinga para todos os AOA na faixa de trabalho estudada foi linear.

Por fim, o efeito de matriz foi avaliado nas amostras de méis florais e mel de melato de bracinga conforme descrito na seção 3.8.3. Os resultados obtidos para cada AOA em ambas as curvas de calibração das matrizes estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18- Verificação do efeito de matriz através do teste de *t-Student*.

Continuação.

AOA	Amostra	t_{cal}	t_{tab}	AOA	Amostra	t_{cal}	t_{tab}
Maleico	Floral	-1,76	4,60	Glicólico	Floral	-4,13	4,60
	Melato	-3,47	9,92		Melato	-0,58	5,84
Malônico	Floral	-4,43	4,60	Lático	Floral	-1,77	4,60
	Melato	-0,52	9,92		Melato	3,78	9,92
Fumárico	Floral	-2,64	4,60	Glucônico	Floral	2,72	5,84
	Melato	-2,85	4,60		Melato	3,96	9,92

Tabela 18- Verificação do efeito de matriz através do teste de *t-Student*.
Conclusão.

AOA	Amostra	t_{cal}	t_{tab}	AOA	Amostra	t_{cal}	t_{tab}
Tartárico	Floral	-4,15	4,60	Succínico	Floral	-4,37	4,60
	Melato	-1,14	9,92		Melato	-0,20	9,92
Fórmico	Floral	6,44	9,92	Glutárico	Floral	-3,62	4,60
	Melato	0,72	4,60		Melato	-0,35	9,92
Cítrico	Floral	-4,10	4,60	Acético	Floral	-2,87	4,60
	Melato	-1,19	5,84		Melato	-0,54	4,60
Málico	Floral	-3,33	5,84	Propiônico	Floral	-4,01	4,60
	Melato	-0,60	5,84		Melato	-0,33	4,60

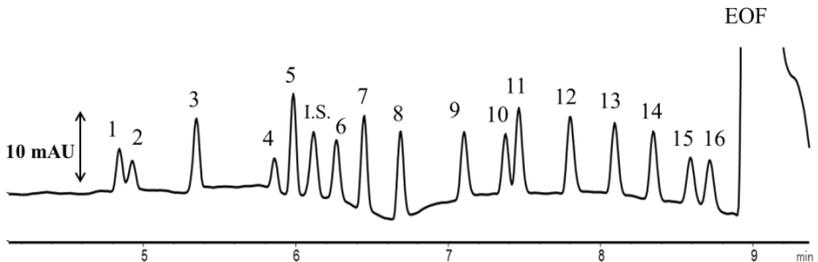
Fonte: Próprio autor.

A partir da Tabela 18 foi observado que, para todos os AOA, ambas as matrizes não interferiram no sinal analítico, visto que, o t calculado foi menor que t tabelado. Desse modo, a quantificação dos AOA nas amostras foi realizada pela utilização da curva de calibração em solução aquosa.

5.5 Seletividade

A seletividade foi avaliada experimentalmente utilizando as mesmas condições descritas na seção 3.5 e 3.8.4. O eletroferograma da separação está demonstrado na Figura 12.

Figura 12 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos obtido por meio da eletroforese capilar de zona para avaliação da seletividade do método.



Legenda: 1- ácido oxálico; 2- ácido maleico; 3- ácido malônico; 4- ácido fumárico; 5- ácido tartárico; I.S.; 6- ácido fórmico; 7- ácido cítrico; 8- ácido málico; 9- ácido glicólico; 10- ácido láctico; 11- ácido glucônico; 12- ácido aspártico; 13- ácido succínico; 14- ácido glutárico; 15- ácido acético e 16 ácido propiônico.

Fonte: Próprio autor.

A partir do eletroferograma demonstrado na Figura 12 foi observado que, nas condições de separação empregada, o método foi seletivo devido a adequada separação de todos os compostos, principalmente, na presença dos possíveis compostos interferentes, ácidos oxálico e aspártico.

5.6 Precisão

Os valores de CV % obtidos na precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os parâmetros de razão de área e tempo de migração corrigidos estão demonstrados na Tabela 19.

Tabela 19- Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os AOA expressos em CV %.

Continuação.

AOA	Concentração (mg L ⁻¹)	Intra-ensaio*		Inter-ensaio**	
		Área corrigida (CV %)	Tempo corrigido (CV %)	Área corrigida (CV %)	Tempo corrigido (CV %)
Maleico	25,79	1,55	0,17	2,54	0,72
	38,69	1,84	0,01	4,42	0,72
	64,48	0,78	0,03	2,38	0,70
Malônico	23,12	1,02	0,11	2,56	0,42
	34,69	1,86	0,01	2,30	0,42
	57,81	1,33	0,02	2,74	0,42
Fumárico	25,79	3,14	0,03	3,63	0,12
	38,69	1,48	0,01	6,70	0,13
	64,48	1,31	0,01	2,44	0,14
Tartárico	33,35	1,19	0,02	2,96	0,11
	50,03	1,37	0,01	1,53	0,11
	83,38	0,87	0,01	2,20	0,11
Fórmico	10,09	3,86	0,01	6,83	0,20
	15,14	3,66	0,00	7,34	0,24
	25,24	2,99	0,01	6,55	0,21
Cítrico	42,69	0,77	0,09	1,39	0,05
	64,04	1,15	0,02	1,24	0,05
	106,74	1,75	0,01	1,96	0,05
Málico	29,80	1,24	0,10	3,41	0,20
	44,70	2,58	0,02	2,06	0,21
	74,50	1,35	0,01	1,51	0,22

Tabela 19- Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os AOA expressos em CV %.

AOA	Concentração (mg L ⁻¹)	Intra-ensaio*		Inter-ensaio**		Conclusão.
		Área corrigida	Tempo corrigido	Área corrigida	Tempo corrigido	
Glicólico	16,71	0,29	0,16	1,08	0,39	
	25,07	2,74	0,02	1,84	0,40	
	41,79	2,07	0,01	1,83	0,41	
Lático	20,02	4,47	0,22	5,14	0,45	
	30,03	4,11	0,03	3,68	0,47	
	50,04	0,62	0,01	2,53	0,48	
Glucônico	48,48	3,63	0,25	4,59	0,43	
	72,71	2,63	0,04	3,70	0,44	
	121,19	1,13	0,01	4,04	0,46	
Succínico	26,24	1,01	0,35	1,42	0,64	
	39,36	0,76	0,06	1,07	0,66	
	65,61	1,05	0,01	1,27	0,69	
Glutárico	25,07	2,15	0,41	2,37	0,69	
	41,79	1,63	0,07	1,81	0,72	
	73,40	0,44	0,02	1,77	0,76	
Acético	13,34	2,47	0,46	2,61	0,74	
	20,02	2,41	0,08	2,73	0,76	
	33,36	0,64	0,02	0,80	0,82	
Propiônico	16,63	1,97	0,42	3,44	0,77	
	24,94	1,34	0,08	3,53	0,80	
	41,57	0,65	0,02	1,11	0,85	

Legenda: * para n=3; ** para n= 9.

Fonte: Próprio autor.

Na precisão intra-ensaio, para área corrigida, os valores de CV variaram de 0,44 a 4,47 % para os ácidos glutárico e láctico, respectivamente, e para o tempo de migração corrigido a variação foi de 0,00 a 0,42 % para os ácidos fórmico e propiônico, respectivamente. Na precisão inter-ensaio os valores de CV para área corrigida variaram de 1,08 a 7,34 % para os ácidos glicólico e fórmico, respectivamente, e para tempo de migração corrigido a variação foi de 0,05 a 0,85 % para os ácidos cítrico e propiônico, respectivamente.

A variabilidade dos resultados de precisão do método são considerados aceitáveis, visto que, para a faixa de concentração que varia de 10 a 100 mg L⁻¹ o CV estipulado é de 20 % e para a faixa de

concentração de 100 a 1000 mg L⁻¹ o CV estipulado é de 15 %, sendo a última faixa de concentração, critério utilizado para os ácidos cítrico e glucônico, os quais possuem níveis de concentração, 106,74 e 121,19 mg L⁻¹, respectivamente (AOAC, 2012).

5.7 Exatidão

A recuperação dos AOAs foi avaliada utilizando três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) nas classes de mel floral e mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) conforme descritos na seção 3.8.6. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20- Média da recuperação para os AOA em amostra de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e floral em três níveis de concentração.

Continuação.

AOA	Nível de Concentração	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	
			Floral	Melato
Maleico	Baixo	6,45	97,55 ± 0,74	99,01 ± 1,47
	Médio	25,79	104,36 ± 0,83	103,31 ± 0,32
	Alto	51,59	104,34 ± 1,74	104,77 ± 0,81
Malônico	Baixo	5,78	81,13 ± 1,47	94,78 ± 1,53
	Médio	23,12	95,53 ± 1,33	104,16 ± 0,84
	Alto	46,25	102,71 ± 1,14	105,95 ± 1,35
Fumárico	Baixo	6,45	92,45 ± 1,23	89,75 ± 0,84
	Médio	25,79	103,40 ± 1,18	91,05 ± 0,51
	Alto	51,59	102,37 ± 1,40	92,90 ± 0,59
Tartárico	Baixo	8,34	95,78 ± 0,98	81,80 ± 1,44
	Médio	33,35	105,55 ± 0,97	98,51 ± 1,08
	Alto	66,71	105,20 ± 1,90	100,95 ± 1,01
Fórmico	Baixo	2,52	84,90 ± 1,05	103,06 ± 0,82
	Médio	10,09	104,86 ± 1,08	90,94 ± 0,60
	Alto	20,19	103,56 ± 1,75	98,46 ± 0,47
Cítrico	Baixo	10,67	103,40 ± 1,61	80,55 ± 0,50
	Médio	42,69	105,58 ± 0,89	95,53 ± 0,96
	Alto	85,39	104,81 ± 1,31	97,72 ± 1,45
Málico	Baixo	7,45	105,24 ± 1,07	96,68 ± 0,87
	Médio	29,80	105,36 ± 1,23	102,77 ± 0,68
	Alto	59,60	105,80 ± 1,31	104,23 ± 0,93
Glicólico	Baixo	4,18	105,08 ± 1,31	97,10 ± 0,94
	Médio	16,71	105,32 ± 1,59	102,00 ± 0,72
	Alto	33,43	105,96 ± 1,33	103,01 ± 0,76

Tabela 20- Média da recuperação para os AOA em amostra de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e floral em três níveis de concentração.

AOA	Nível de concentração	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)		Conclusão.
			Floral	Melato	
Lático	Baixo	5,00	105,42 ± 1,39	97,93 ± 1,56	
	Médio	20,02	106,16 ± 0,59	106,93 ± 0,69	
	Alto	40,04	103,03 ± 1,60	106,11 ± 1,94	
Glucônico	Baixo	12,12	97,85 ± 1,54	100,72 ± 1,66	
	Médio	48,48	98,33 ± 1,32	91,04 ± 0,96	
	Alto	96,95	96,53 ± 1,08	90,27 ± 0,61	
Succínico	Baixo	6,56	104,66 ± 1,19	94,95 ± 1,35	
	Médio	26,24	105,94 ± 0,94	104,75 ± 0,87	
	Alto	52,47	106,28 ± 0,88	103,93 ± 1,17	
Glutárico	Baixo	7,34	92,11 ± 0,86	88,39 ± 1,63	
	Médio	29,36	105,82 ± 0,89	103,13 ± 0,52	
	Alto	58,72	106,26 ± 1,63	105,21 ± 0,97	
Acético	Baixo	3,34	104,99 ± 1,22	95,91 ± 1,40	
	Médio	13,34	104,98 ± 1,25	95,04 ± 0,64	
	Alto	26,69	104,55 ± 2,01	93,22 ± 0,93	
Propiônico	Baixo	4,16	85,57 ± 1,11	96,01 ± 1,42	
	Médio	16,63	104,31 ± 1,66	101,09 ± 1,22	
	Alto	33,25	100,38 ± 2,05	99,00 ± 0,79	

Fonte: Próprio autor.

A partir da Tabela 20 foi observado que os valores de recuperação aparente para o nível de concentração baixo variaram de 81,13 a 105,42 % para a amostra de mel floral e de 80,55 a 103,06 % para a amostra de mel de melato de bracatinga. Para o nível de concentração médio os valores variaram de 95,53 a 106,16 % e 90,94 a 106,93 % para as amostras de mel floral e mel de melato de bracatinga, respectivamente. Para o nível de concentração alto os valores de recuperação variaram de 96,53 a 106,28 % e 92,90 a 106,11 % para as amostras de mel floral e mel de melato de bracatinga, respectivamente.

Apesar de ser observado elevada variabilidade na recuperação dos analitos nas duas classes de méis, na Tabela 21 são demonstradas as faixas de concentração e recuperação aceitáveis, segundo recomendação da AOAC e do MAPA (AOAC, 2012; BRASIL, 2011) para os analitos investigados.

Tabela 21 - Valores recomendados aceitáveis e resultados de recuperação obtidos para os ácidos orgânicos alifáticos expressos em faixas de concentração.

Faixa de concentração	Nível de concentração	Faixa de recuperação
$1000 \leq C < 10000 \mu\text{g kg}^{-1}$	Baixo	80 - 110 % ^(a)
$10 \leq C < 100 \text{mg kg}^{-1}$	Médio e Alto	90 - 107 % ^(b)

Legenda: ^a Com exceção dos ácidos glucônico e cítrico; ^b Incluindo os ácidos glucônico e cítrico.

Fonte: (AOAC, 2012; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

Baseado em valores aceitáveis e nos resultados obtidos, a recuperação determinada nas amostras de méis podem ser consideradas adequadas para todos os analitos.

5.8 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Nesse trabalho, os LOD e LOQ foram avaliados em solução aquosa e em solução em matriz, conforme descrito na seção 3.8.7. Normalmente esses parâmetros não são avaliados em solução em matriz porém, representam os limites reais, ou seja, demonstram se a matriz pode apresentar alguma influência na variação dos resultados quando comparados aos resultados da solução aquosa e, segundo o Inmetro (INMETRO, 2016), o LOD para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. Dessa forma, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22- Limite de detecção e quantificação avaliados em solução aquosa e matriz para os ácidos orgânicos alifáticos.

Continuação.

AOA	Solução aquosa		Solução em matriz	
	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
Maleico	0,71	2,38	1,12	3,72
Malônico	0,12	0,39	0,99	3,30
Fumárico	0,72	2,42	1,30	4,34
Tartárico	0,30	1,01	0,77	2,57
Fórmico	0,21	0,70	0,40	1,32
Cítrico	0,52	1,72	1,17	3,90
Málico	0,60	1,99	1,17	3,91
Glicólico	0,09	0,30	0,29	0,96

Tabela 22- Limite de detecção e quantificação avaliados em solução aquosa e matriz para os ácidos orgânicos alifáticos.

AOA	Conclusão			
	Solução aquosa		Solução em matriz	
	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Lático	0,17	0,56	0,23	0,77
Glucônico	0,30	1,00	0,74	2,46
Succínico	0,34	1,14	0,53	1,78
Glutário	0,07	0,25	0,30	0,98
Acético	0,20	0,68	0,48	1,61
Propiônico	0,19	0,62	0,48	1,60

Fonte: Próprio autor.

Nesse trabalho, o LOD avaliado em solução aquosa, variou de 0,07 a 0,72 mg L⁻¹, os quais, correspondem aos ácidos glutárico e fumárico, respectivamente. Da mesma maneira, ambos os ácidos apresentaram, os menores e maiores LOQ, variando de 0,25 a 2,42 mg L⁻¹, respectivamente.

Os LOD e LOQ do ácido glutárico, também avaliados em solução aquosa e com CE, foram de 0,29 mg L⁻¹ e 0,48 mg L⁻¹, respectivamente (KLAMPFL; KATZMAYR; BUCHBERGER, 1998). E para o ácido fumárico, apenas foi encontrado na literatura a determinação do LOD em solução aquosa, o qual foi de 2,32 mg L⁻¹ (GALLI; BARBAS, 2004)

Nesse trabalho, os LOD e LOQ foram avaliados em matriz, sendo que, o LOD variou de 0,30 a 1,30 mg L⁻¹ para os ácidos glutárico e fumárico, respectivamente, e o LOQ apresentou variação de 0,77 a 4,34 mg L⁻¹ para os ácidos lático e fumárico, respectivamente.

Comumente, a avaliação desses parâmetros não são realizadas na matriz e portanto, na literatura, apenas os LOD dos ácidos fumárico e lático foram avaliados em solução em matriz (café) por meio da CE, os quais, são de 1,16 mg L⁻¹ para o ácido fumárico e 181,06 mg L⁻¹ para o ácido lático (GALLI; BARBAS, 2004). Contudo, foi observado novamente, que os LOD e LOQ avaliados nesse estudo foram menores comparados aos LOD e LOQ determinados por Galli e Barbas (2004) mesmo que em outra matriz.

Na Tabela 22, foi observado que os resultados obtidos para os LOD e LOQ em solução aquosa e solução em matriz foram distintos, visto que, os LOD e LOQ para solução em matriz foram maiores quando comparados à solução aquosa, indicando que a matriz pode interferir na avaliação desse parâmetro; e os LOD e LOQ nesse trabalho, foram

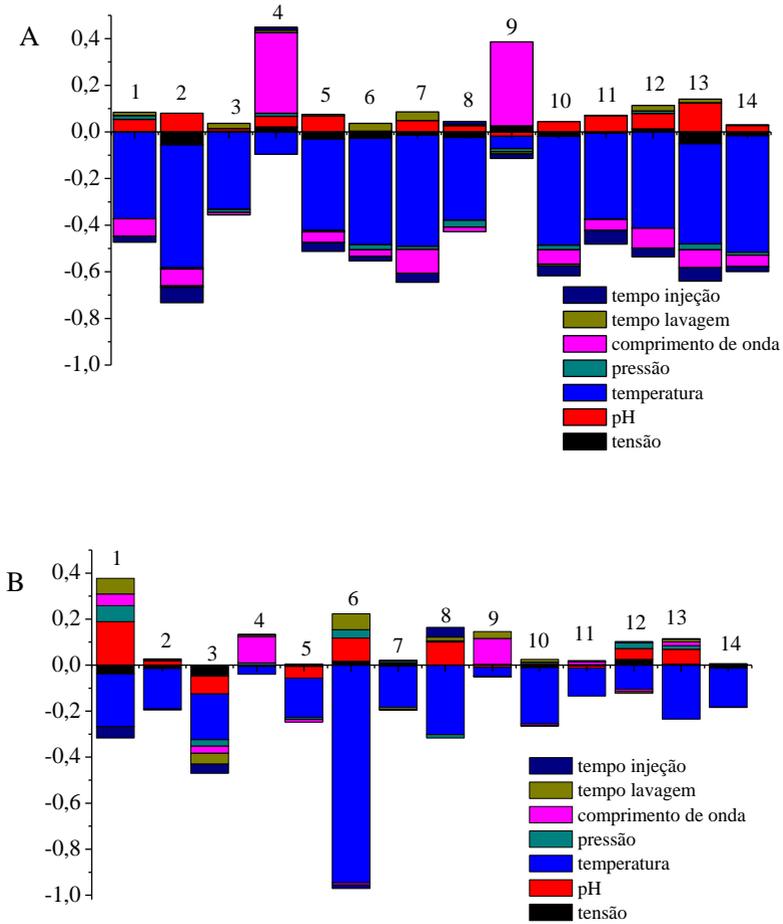
menores em solução aquosa e em matriz quando comparados aos trabalhos da literatura.

5.9 Robustez

A robustez foi avaliada conforme descrito na seção 3.8.8 e as tabelas referentes aos resultados obtidos podem ser consultadas nos Apêndices B; C; D; E e F.

Os resultados expostos nas Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 representam uma soma da contribuição de cada parâmetro investigado, ou seja, de quanto foi a influência na área corrigida, tempo de migração corrigido, concentração, simetria e resolução dos AOA, quando realizado pequenas alterações nos parâmetros analíticos.

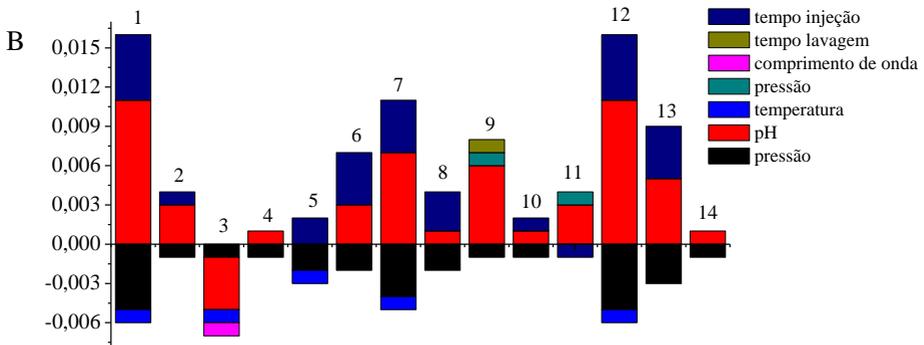
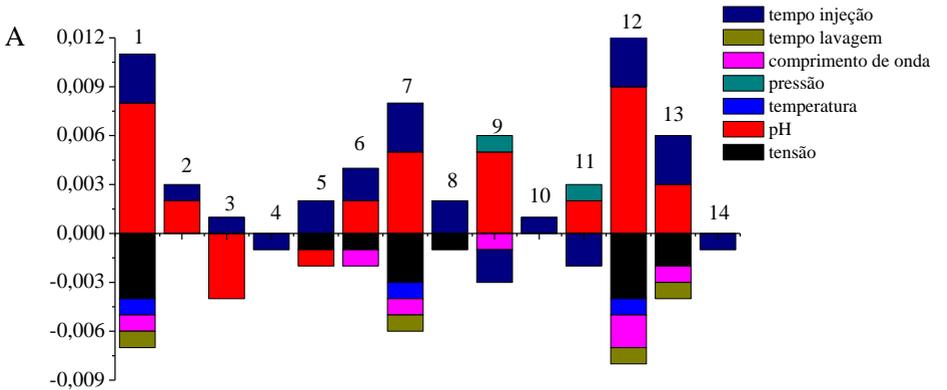
Figura 13 - Influência dos parâmetros analíticos sob a área corrigida dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.



Legenda: A- solução aquosa; B- solução em matriz; 1- acético; 2- cítrico; 3- fórmico; 4- fumárico; 5- glicólico; 6- glucônico; 7- glutárico; 8- láctico; 9- maleico; 10- málico; 11- malônico; 12- propiônico; 13- succínico; 14- tartárico.

Fonte: Próprio autor.

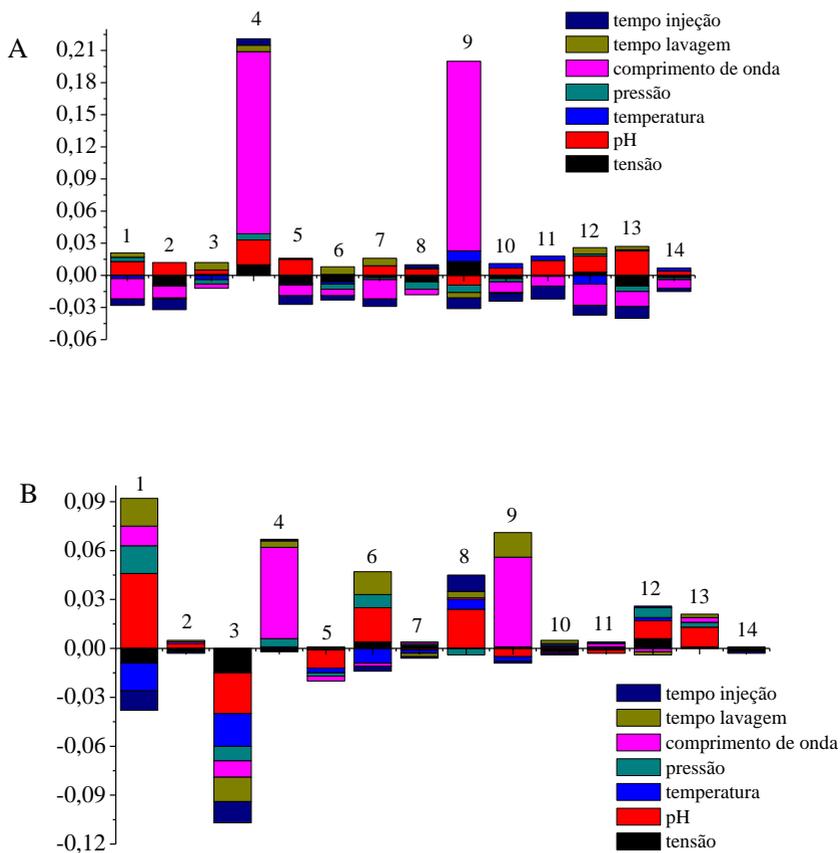
Figura 14 - Influência dos parâmetros analíticos sob o tempo de migração corrigido dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.



Legenda: A- solução aquosa; B- solução em matriz; 1- acético; 2- cítrico; 3- fórmico; 4- fumárico; 5- glicólico; 6- glucônico; 7- glutárico; 8- láctico; 9- maleico; 10- málico; 11- malônico; 12- propiônico; 13- succínico; 14- tartárico.

Fonte: Próprio autor.

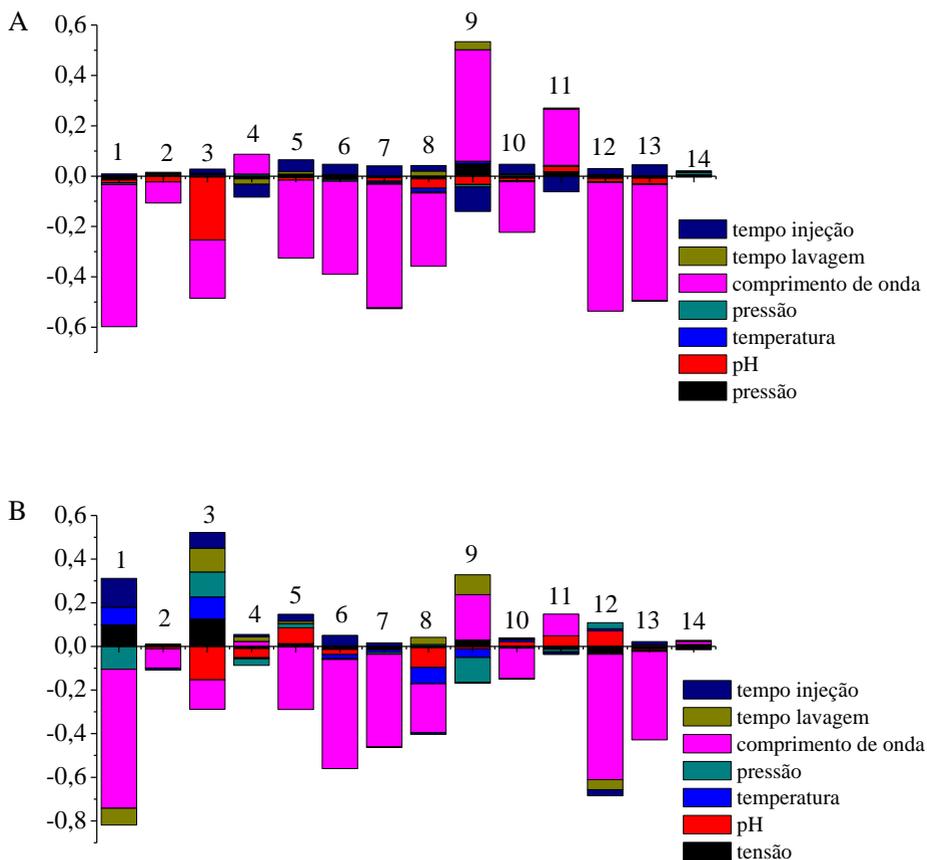
Figura 15- Influência dos parâmetros analíticos sob a concentração dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.



Legenda: A- solução aquosa; B- solução em matriz; 1- acético; 2- cítrico; 3- fórmico; 4- fumárico; 5- glicólico; 6- glucônico; 7- glutárico; 8- láctico; 9- maleico; 10- málico; 11- malônico; 12- propiônico; 13- succínico; 14- tartárico.

Fonte: Próprio autor.

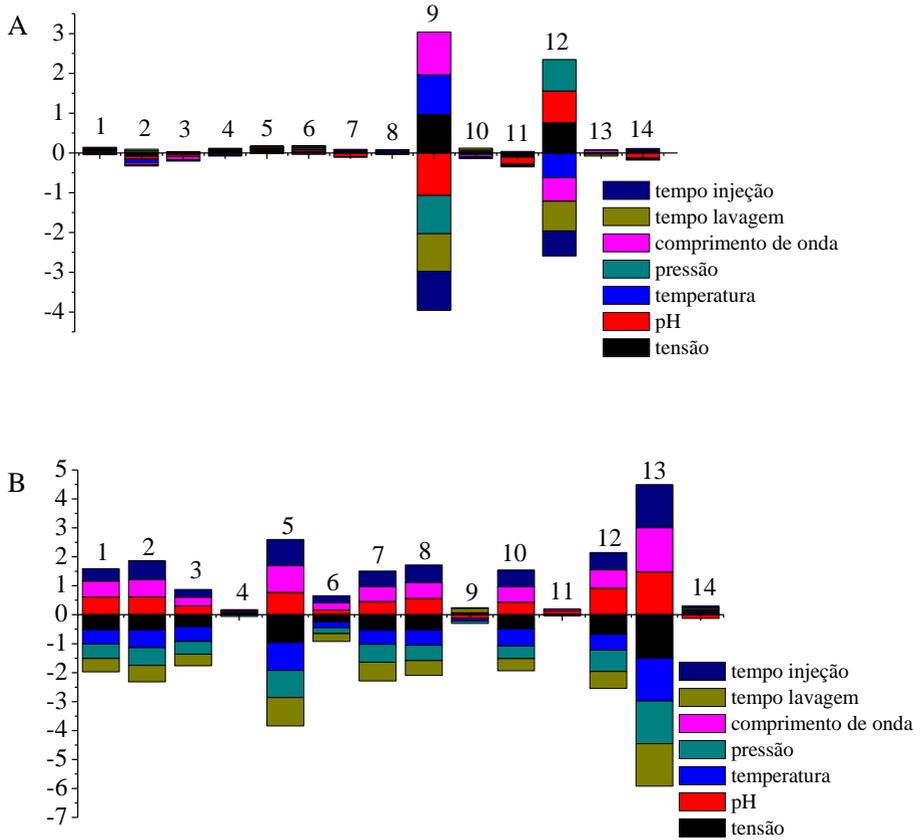
Figura 16- Influência dos parâmetros analíticos sob a simetria dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.



Legenda: A- solução aquosa; B- solução em matriz; 1- acético; 2- cítrico; 3- fórmico; 4- fumárico; 5- glicólico; 6- glucônico; 7- glutárico; 8- láctico; 9- maleico; 10- málico; 11- malônico; 12- propiônico; 13- succínico; 14- tartárico.

Fonte: Próprio autor.

Figura 17 – Influência dos parâmetros analíticos sob a simetria dos ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa e matriz.



Legenda: A- solução aquosa; B- solução em matriz; 1- acético; 2- cítrico; 3- fórmico; 4- fumárico; 5- glicólico; 6- glucônico; 7- glutárico; 8- láctico; 9- maleico; 10- málico; 11- malônico; 12- propiônico; 13- succínico; 14- tartárico.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 13 foi observado que a temperatura foi o parâmetro que mais influenciou na área corrigida para todos os analitos, seguido do comprimento de onda que também demonstrou ter contribuição com maior intensidade para as áreas corrigidas dos analitos fumárico e maleico, além do pH que apresentou maior influência nas áreas corrigidas dos ácidos succínico e cítrico, tanto em solução aquosa e também na matriz. Os demais parâmetros influenciaram em, praticamente, igual proporção e apresentaram pouca ou nenhuma influência na área corrigida dos AOA.

Na Figura 14 o parâmetro tempo de injeção influenciou no tempo corrigido de todos os analitos em solução aquosa, além disso, o pH apresentou elevada influência no tempo corrigido de todos os analitos, com exceção dos ácidos fumárico, láctico, málico e tartárico. Ainda para a curva aquosa, o parâmetro tensão apresentou maior influência no tempo corrigido dos ácidos acético, glicólico, glucônico, glutárico, láctico, propiônico e succínico. A solução em matriz apresentou comportamento similar a solução aquosa porém o parâmetro tempo de injeção não apresentou influência no tempo corrigido dos ácidos tartárico, maleico, fórmico e fumárico.

Na Figura 15, o parâmetro comprimento de onda apresentou significativa influência na concentração dos ácidos maleico e fumárico para solução aquosa. Tal fato repetiu-se na solução em matriz e ainda observou-se que a tensão apresentou maior influência na concentração dos ácidos acético, fórmico, glucônico e láctico.

Na Figura 16 o parâmetro comprimento de onda apresentou elevada influência na simetria de todos os analitos, com exceção dos ácido tartárico em solução aquosa. Ainda, para solução aquosa os parâmetros tempo de injeção e tensão apresentaram maior influência na simetria do ácido maleico. Além disso, para solução em matriz, os parâmetros tempo de injeção, temperatura, tensão, e pressão, além do comprimento de onda, influenciaram na simetria do ácido acético. Tal fato também foi observado para o ácido fórmico que além dos cinco parâmetros anteriormente relatados, os parâmetros pH e tempo de lavagem também influenciaram na simetria.

Na Figura 17 o perfil dos resultados obtidos para a solução aquosa e matriz foram distintos, visto que, para a solução aquosa os sete parâmetros influenciaram significativamente, principalmente, na resolução dos ácidos maleico e propiônico. Porém para a solução em matriz, a influência dos sete parâmetros foi intensa na resolução de nove dos 14 ácidos investigados, sendo eles, acético, cítrico, fórmico, glicólico, glutárico, láctico, málico, propiônico e succínico. Ainda, os parâmetros

avaliados apresentaram pouca influência na resolução dos ácidos fumárico e malônico.

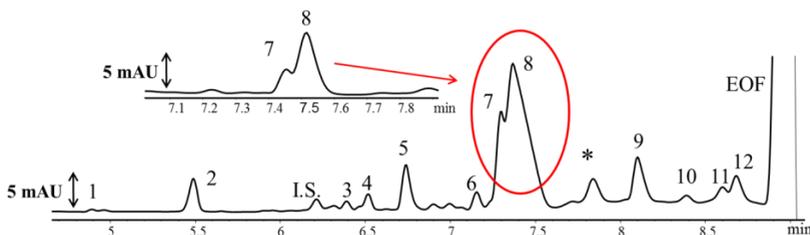
Apesar da robustez tratar-se de um estudo que permite ordenar e identificar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, a sua avaliação no procedimento de validação analítica é considerada um parâmetro opcional e, por esse motivo não há limites máximos aceitáveis. Apenas é considerado que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse em relação à sua precisão (INMETRO, 2016).

A partir de todos os resultados expostos, foi observado que, apesar de todos os parâmetros avaliados (tempo de injeção e de lavagem, comprimento de onda, pressão, temperatura, pH e tensão) apresentarem influência na área corrigida, tempo de migração corrigido, concentração, simetria e resolução, a contribuição de cada parâmetro foi pouco relevante e demonstrou que o método proposto foi robusto para todos os analitos.

6 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.)

O método desenvolvido e validado foi aplicado em cinco amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) do estado de Santa Catarina a fim de avaliar as concentrações de AOA. Na Figura 18 é apresentado o eletroferograma da separação de AOA em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.).

Figura 18 – Eletroferograma da separação dos AOA em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) da cidade de Urubici.



Legenda: *desconhecido; 1- ácido maleico; 2- ácido malônico; I.S.- ácido glicóxico; 3- ácido fórmico; 4- ácido cítrico; 5- ácido málico; 6- ácido glicólico; 7- ácido lático; 8- ácido glucônico; 9- ácido succínico; 10- ácido glutárico; 11- ácido acético; 12- ácido propiônico.

Fonte: Próprio autor.

A partir da Figura 18 foi observado que, com a exceção dos ácidos fumárico e tartárico, todos os AOA foram determinados em tempo inferior a 10 minutos, na amostra de mel de melato de bracatinga oriunda de Urubici. O eletroferograma também demonstrou visualmente que todos os picos apresentaram adequada eficiência e resolução.

Os resultados de determinação dos AOA nas amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) estão demonstrados na Tabela 23.

Tabela 23- Ácidos orgânicos alifáticos (mg 100 g⁻¹) presentes em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) do estado de Santa Catarina.

AOA	Lages	São Joaquim	Urubici	Urupema	Bom Retiro
Maleico	40,94 ± 1,50	41,64 ± 1,23	53,99 ± 1,45	72,70 ± 2,15	79,10 ± 1,53
Malônico	259,45 ± 10,60	308,79 ± 7,63	329,74 ± 11,92	288,07 ± 11,51	330,57 ± 13,63
Fumárico	nd	nd	nd	nd	nd
Tartárico	nd	nd	nd	nd	nd
Fórmico	39,79 ± 1,06	72,86 ± 2,56	43,66 ± 1,33	87,85 ± 2,23	54,67 ± 0,76
Cítrico	259,50 ± 8,57	244,02 ± 5,99	157,54 ± 5,20	170,87 ± 3,16	227,00 ± 2,27
Málico	302,40 ± 3,65	595,40 ± 25,87	445,65 ± 4,59	414,69 ± 16,60	390,18 ± 11,35
Glicólico	90,08 ± 3,12	97,85 ± 3,25	100,64 ± 3,85	90,15 ± 3,10	98,06 ± 0,97
Lático	1.542,98 ± 19,70	1045,85 ± 32,77	931,53 ± 39,99	1272,10 ± 34,40	1372,56 ± 12,57
Glucônico	6.198,84 ± 152,23	4.477,79 ± 130,71	5.582,34 ± 96,47	7.415,58 ± 292,12	6.589,74 ± 143,07
Succínico	660,04 ± 23,43	651,58 ± 8,68	537,12 ± 18,61	484,17 ± 5,68	672,55 ± 7,33
Glutárico	94,55 ± 1,35	118,71 ± 4,28	89,11 ± 2,98	111,49 ± 3,39	114,21 ± 0,72
Acético	63,06 ± 0,93	111,03 ± 4,00	104,86 ± 3,33	80,57 ± 2,74	134,91 ± 4,09
Propiônico	196,41 ± 6,77	296,91 ± 7,90	180,97 ± 6,69	242,30 ± 6,03	257,77 ± 4,50
Soma	9.748,05	8.062,41	8.557,14	10.730,55	10.321,31

Legenda: nd - não detectado.

Fonte: Próprio autor.

Nas cinco amostras de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) avaliadas, todos os AOA investigados foram identificados e quantificados, com exceção dos ácidos fumárico e tartárico. Apesar de não detectar os ácidos fumárico e tartárico nas amostras de mel de melato de bracinga do estado de Santa Catarina, tais ácidos foram encontrados por Haroun e colaboradores (2012) em méis de melato de pinus (*Pinus* sp.) originados da Turquia (região desconhecida) com concentrações que variaram de 0,64 a 5,67 mg 100 g⁻¹ para o ácido fumárico e 6,79 a 20,88 mg 100 g⁻¹ para o ácido tartárico. Para os mesmos ácidos orgânicos, Ohmenhaeuser e colaboradores (2013) encontraram em méis de melato oriundos da Alemanha concentrações de 4,00 e 66,00 mg 100 g⁻¹ de ácido fumárico e tartárico, respectivamente.

Conforme demonstrado na Tabela 23, o ácido glucônico foi o AOA majoritário nos méis de melato de bracinga, apresentando concentrações que variaram de 4.477,79 a 7.415,58 mg 100 g⁻¹. O ácido glucônico também foi detectado por Nozal e colaboradores (2003A) e Sanz e colaboradores (2005) em mel de melato (*Quercus ilex* e *Quercus*), ambos originados da Espanha (região desconhecida) e por Tezcan e colaboradores (2011) em mel de melato de pinus originados da Província de Mugla, Turquia. As concentrações de ácido glucônico, com relação aos três trabalhos reportados, variaram de 118,00 a 404,30 mg 100 g⁻¹, as quais foram muito inferiores as concentrações de ácido glucônico determinadas nesse trabalho.

O ácido láctico foi o segundo ácido em maior concentração nos méis de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) apresentando variação de 931,56 a 1.542,98 mg 100 g⁻¹. Segundo a literatura, até o momento, nenhum estudo havia determinado o ácido láctico em mel de melato.

Os AOA: succínico, cítrico, málico e propiônico também foram ácidos que apresentaram elevadas concentrações nos méis de melato de bracinga avaliados nesse trabalho. O ácido succínico apresentou concentrações que variaram de 484,17 (Urupema) a 672,55 mg 100 g⁻¹ (Bom Retiro), as quais foram concentrações muito superiores ao quantificado por Haroun e colaboradores (2012) em mel de melato de pinus (*Pinus* sp.) originados da Turquia (região desconhecida), que variaram de 34,87 a 132,90 mg 100 g⁻¹ de ácido succínico.

O ácido cítrico, além de ser determinado em mel de melato de bracinga nesse trabalho com concentração que variou de 157,54 a 259,50 mg 100 g⁻¹, foi determinado em méis de melato de pinus originados na Turquia em concentrações inferiores, variando de 12,4 a 78,22 mg 100 g⁻¹ (HAROUN et al., 2012; TEZCAN et al., 2011).

Nas amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) avaliadas nesse trabalho, as concentrações de ácido málico variaram de 302,40 (Lages) a 595,40 mg 100 g⁻¹ (São Joaquim), as quais, foram superiores as concentrações de ácido málico determinados em mel de melato de pinus (*Pinus sp.*) oriundos da Turquia, que variou de 0,67 a 25,7 mg 100 g⁻¹ (HAROUN et al., 2012; TEZCAN et al., 2011). Para o ácido propiônico a concentração variou de 180,97 (Urubici) a 296,91 (São Joaquim) mg 100 g⁻¹, a qual, foi superior a concentração de ácido propiônico determinada por Nozal e colaboradores (2003A) em mel de melato (*Quercus ilex*) da Espanha, representando 65,7 mg 100 g⁻¹.

Os ácidos malônico e glicólico apresentaram concentrações, nas amostras de méis de melato de bracatinga, que variaram de 259,45 a 330,57 mg 100 g⁻¹ e 90,08 a 100,64 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Foi verificado na literatura que até o momento não havia relatos da determinação desses ácidos em mel de melato e dessa maneira, representando elevada contribuição para a pesquisa científica e também destacando o ineditismo desse trabalho.

Foi observado que, até o momento o ácido glutárico havia sido determinado apenas em mel de melato (*Quercus ilex*) originados da Espanha (região desconhecida) com concentração média de 17 mg 100 g⁻¹ (NOZAL et al., 2003a) a qual, foi inferior a concentração determinada em mel de melato de bracatinga nesse trabalho, variando de 89,11 a 118,71 mg 100 g⁻¹ de ácido glutárico.

Nesse trabalho, a amostra de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) oriunda de São Joaquim, foi a que apresentou menores concentrações de AOA, visto que, a soma desses compostos foi de 8.062,41 mg 100 g⁻¹, quando comparada a amostra de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) oriunda de Urupema que apresentou as maiores concentrações de AOA, uma vez que, a soma desses compostos foi de 10.730,55 mg 100 g⁻¹.

Na Tabela 23 também pode ser observado que as concentrações dos AOA apresentaram elevada variabilidade em relação as diferentes cidades onde as amostras foram coletadas. Por exemplo, o ácido acético apresentou concentração de 63,06 mg 100 g⁻¹ na amostra oriunda de Lages, enquanto o mesmo ácido apresentou concentração de 134,91 mg 100 g⁻¹ para a amostra obtida de Bom Retiro, correspondendo a uma diferença de praticamente 72 mg 100 g⁻¹ a mais de ácido acético na amostra de mel de melato de bracatinga de Bom Retiro. O mesmo fato foi observado para o ácido láctico que apresentou concentração de 931,53 100 g⁻¹ na amostra de Urubici e concentração de 1.542,98 mg 100 g⁻¹ na

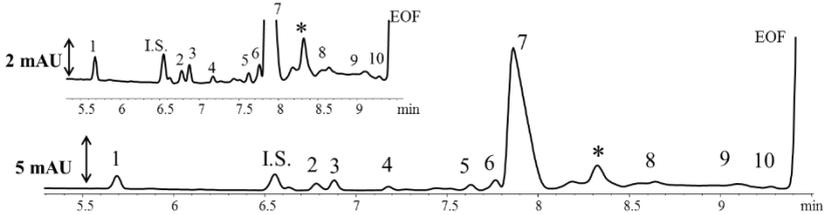
amostra de Lages, além de outros ácidos como o glucônico que apresentou uma diferença de $2.938 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ a mais na amostra oriunda de Urupema comparada com a amostra de São Joaquim.

As elevadas variabilidades nas concentrações do mesmo ácido porém de amostras de méis de diferentes regiões demonstram que as diferentes regiões geográficas e, supostamente os períodos de colheita e as condições meteorológicas, podem influenciar diretamente na concentração de AOA em méis.

7 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM MEL FLORAL

O método desenvolvido e validado foi aplicado em cinco amostras de méis florais do estado de Santa Catarina afim de avaliar as concentrações de AOA. Na Figura 19 é apresentado o eletroferograma da separação de AOA em mel floral.

Figura 19 - Eletroferograma da separação dos ácidos orgânicos alifáticos em mel floral da cidade de Lages.



Legenda: *desconhecido; 1- ácido malônico; I.S.- ácido glicoxílico; 2- ácido fórmico; 3- ácido cítrico; 4- ácido málico; 5- ácido glicólico; 6- ácido láctico; 7- ácido glucônico; 8- ácido succínico; 9- ácido acético; 10- ácido propiônico.

Fonte: Próprio autor.

Especialmente a Figura 19, a qual representa a separação dos AOA em mel floral oriunda de Lages, não detectou os ácidos: fumárico, tartárico, maleico e glutárico porém, os demais AOA foram determinados em tempo inferior a 10 min. A Figura 19 também demonstrou que, principalmente, devido ao ácido glucônico apresentar maior concentração, nessa representação, a eficiência desse ácido sobressaiu quando comparado aos demais AOA. Os resultados de determinação dos AOA nas amostras de méis florais estão demonstrados na Tabela 24.

Tabela 24- Ácidos orgânicos alifáticos (mg 100 g⁻¹) presentes em méis florais do estado de Santa Catarina.

AOA	Lages	São Joaquim	Urubici	Urupema	Bom Retiro
Maleico	nd	10,16 ± 0,24	14,35 ± 0,16	12,28 ± 0,36	9,09 ± 0,35
Malônico	82,25 ± 0,43	117,92 ± 3,79	109,22 ± 0,84	133,98 ± 1,74	87,74 ± 1,01
Fumárico	nd	nd	nd	nd	nd
Tartárico	nd	nd	nd	nd	nd
Fórmico	37,99 ± 0,48	46,32 ± 1,97	61,54 ± 0,61	67,87 ± 1,43	18,80 ± 0,77
Cítrico	107,77 ± 0,31	505,84 ± 16,47	62,66 ± 1,73	70,91 ± 0,98	48,22 ± 0,86
Málico	23,43 ± 0,33	19,88 ± 0,18	33,00 ± 0,51	132,02 ± 3,99	49,62 ± 0,65
Glicólico	27,77 ± 1,36	42,22 ± 0,66	29,60 ± 0,79	43,70 ± 1,18	27,49 ± 1,24
Lático	72,61 ± 0,26	68,02 ± 1,05	31,25 ± 0,69	84,35 ± 1,35	87,29 ± 0,95
Glucônico	4.522,67 ± 36,75	4.565,92 ± 200,71	8.711,98 ± 244,06	5.449,52 ± 61,87	4.480,92 ± 98,47
Succínico	12,68 ± 0,17	13,31 ± 3,50	25,43 ± 0,10	96,38 ± 0,77	49,00 ± 1,45
Glutárico	nd	nd	nd	21,24 ± 0,45	nd
Acético	20,46 ± 0,69	58,37 ± 2,40	26,69 ± 0,70	27,56 ± 0,66	13,68 ± 0,31
Propiônico	10,26 ± 0,36	16,30 ± 0,34	22,76 ± 0,64	55,84 ± 1,72	21,52 ± 0,73
Soma	4.917,90	5.464,25	9.128,48	6.195,65	4.893,35

Legenda: nd – não detectado.

Fonte: Próprio autor

Da mesma maneira que para o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), para o mel floral os ácidos fumárico e tartárico não foram detectados. Apesar desses ácidos não estarem presentes em concentrações detectáveis nas amostras de mel floral do estado de Santa Catarina, os ácidos fumárico e tartárico foram determinados por Haroun e colaboradores (2012) em mel floral de castanha originados da Turquia (região desconhecida) com concentrações mínima e máxima de 0,16 a 3,60 mg 100 g⁻¹ e 2,14 a 4,42 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Para os mesmos ácidos, Ohmenhaeuser e colaboradores (2013) determinaram em amostra de mel floral de castanheiro oriundas da Alemanha, concentrações médias de 5,00 mg 100 g⁻¹ de ácido fumárico e 64,00 mg 100 g⁻¹ de ácido tartárico.

O ácido maleico não foi detectado na amostra de mel floral de Lages, porém apresentou concentração de 9,09 mg 100 g⁻¹ na amostra de mel floral de Bom Retiro, sendo majoritário na amostra de mel floral oriunda de Urubici com concentração de 14,35 mg 100 g⁻¹ de ácido maleico. Suarez Luque e colaboradores (2002) determinaram o ácido maleico em amostras de méis florais de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e de castanheiro (*Castea sativa* Miller), ambas originadas da região de Galícia, Espanha. As concentrações médias de ácido maleico foram de 0,003 mg 100 g⁻¹ em ambas as amostras (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002), as quais, foram inferiores as concentrações de ácido maleico em amostras de méis florais de pinus (*Pinus* sp.) e de castanheiro (*Castanea* sp.) oriundas da Turquia, com teores variando de 0,36 a 1,37 mg 100 g⁻¹ de ácido maleico (HAROUN et al., 2012).

O ácido glutárico foi quantificado apenas na amostra de mel floral oriunda de Urupema com concentração de 21,24 mg 100 g⁻¹. Esse ácido apresentou concentração média de 25,40 mg 100 g⁻¹ em mel floral de lavanda (*Lavandula latifolia*) e de 7,30 mg 100 g⁻¹ em mel floral de tomilho (*Thymus vulgaris*), ambas amostras oriundas da Espanha (região desconhecida) (NOZAL et al., 2003a). O ácido láctico representou elevada variabilidade na concentração das amostras de méis florais avaliada nesse trabalho, a qual variou de 31,25 mg 100 g⁻¹ para a amostra originada de Urubici a 87,29 mg 100 g⁻¹ para a amostra originada de Bom Retiro. Porém, esse ácido foi quantificado por Mato e colaboradores (2006) em amostras de méis florais oriundas da Espanha em menor concentração, representando 20,89 mg 100 g⁻¹ de ácido láctico.

Foi observado também elevada variabilidade na concentração de cada ácido das amostras de méis florais de diferentes regiões geográficas. Por exemplo, o ácido cítrico na amostra de mel floral oriunda de Bom

Retiro apresentou concentração de 48,22 mg 100 g⁻¹ e para a amostra oriunda de São Joaquim a concentração de ácido cítrico foi de 505,84 mg 100 g⁻¹. O mesmo acontece para o ácido málico, que na amostra oriunda de São Joaquim apresentou concentração de 19,88 mg 100 g⁻¹ e na amostra oriunda de Urupema, concentração de ácido málico foi de 132,02 mg 100 g⁻¹.

Os ácidos cítrico e málico também foram determinados em amostras de méis florais da Espanha e Turquia. Para as amostras multifloral e castanheiro (*Castea sativa* Miller) de Galicia (Espanha), o ácido cítrico, apresentou concentrações de 12,40 mg 100 g⁻¹ e 30,40 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Para ambas as amostras, a concentração de ácido málico foi de 11,70 mg 100 g⁻¹ e 32,00 mg 100 g⁻¹, respectivamente (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002). As concentrações dos ácidos cítrico e málico determinadas por Haroun e colaboradores (2012) em amostras de méis florais de pinus (*Pinus* sp.) oriundas da Turquia, apresentaram variação na concentração de 78,22 a 139,42 mg 100 g⁻¹ de ácido cítrico e 3,85 a 34,41 mg 100 g⁻¹ de ácido málico.

O ácido glucônico foi majoritariamente quantificado em todas as amostras de mel floral com concentrações que variaram de 4.522,67 mg 100 g⁻¹ para o mel floral de Lages à 8.711,98 mg 100 g⁻¹ para o mel floral de Urubici. O ácido glucônico também foi o ácido majoritário em méis multiflorais, de lavanda (*Lavandula latifolia*) e de tomilho (*Thymus vulgaris*) da Espanha (região desconhecida), sendo que as concentrações de ácido glucônico foram de 352,30; 376,2 e 386,30 mg 100 g⁻¹, respectivamente (NOZAL et al., 2003a). Além disso, em mel floral de acacia das regiões de Zonguldak, Eregli e Görele da Turquia, a concentração de ácido glucônico variou de 890,40 a 1.378,00 mg 100 g⁻¹ (TEZCAN et al., 2011).

Da mesma maneira que no mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e segundo os trabalhos disponíveis até o momento, os ácidos malônico e glicólico foram determinados pela primeira vez na matriz de mel floral, com concentrações que variam de 82,25 a 133,98 mg 100 g⁻¹ e 27,77 a 43,70 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

A concentração de ácido fórmico variou de 18,80 mg 100 g⁻¹ para a amostra de mel floral oriunda de Bom Retiro a 67,87 mg 100 g⁻¹ para a amostra de mel floral de Urupema, sendo que, em amostras de méis de tomilho (*Thymus vulgaris*) da Espanha (região desconhecida) a concentração de ácido fórmico foi inferior a determinada nesse trabalho, variando de 4,6 a 15,2 mg 100 g⁻¹ (NOZAL et al., 2003a). A concentração de ácido acético apresentou variação de 13,68 mg 100 g⁻¹ para a amostra de mel floral oriunda de Bom Retiro a 58,37 mg 100 g⁻¹ para a amostra de

mel floral de São Joaquim. Sendo que, o teor de ácido acético também foi determinado por Mato e colaboradores (2006) em mel floral de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) da região de Gálícia, Espanha, e o mesmo apresentou concentração média de 32,5 mg 100 g⁻¹.

Para o ácido propiônico, a concentração variou de 10,26 mg 100 g⁻¹ para a amostra de mel floral de Lages a 55,84 mg 100 g⁻¹ para a amostra de mel floral de Urupema, as quais, foram inferiores as concentrações de ácido propiônico determinada por Nozal e colaboradores (2003) em méis multiflorais e de lavanda (*Lavandula latifolia*) da Espanha (região desconhecida), representando 99,50 e 87,10 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

Nesse trabalho, a amostra de mel oriunda de Bom Retiro, foi a que apresentou menores concentrações de AOA, visto que, a soma desses compostos foi de 4.893,35 mg 100 g⁻¹, quando comparada a amostra de mel floral oriunda de Urubici que apresentou as maiores concentrações de AOA, uma vez que, a soma desses compostos foi de 9.128,48 mg 100 g⁻¹.

Novamente, as elevadas variabilidades nas concentrações do mesmo ácido porém de amostras de méis de diferentes regiões demonstram que as diferentes regiões geográficas e, supostamente os períodos de colheita e as condições meteorológicas, podem influenciar diretamente na concentração de AOA em méis.

8 MEL DE MELATO DE BRACATINGA versus MEL FLORAL: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS

Foi observado, durante as discussões realizadas nas seções 6 e 7, as quais referem-se as quantificações de AOA em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e mel floral, respectivamente, que a soma das concentrações de todos os AOA em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) são maiores que a soma das concentrações de AOA em mel floral, as quais variaram de 8.062,41 a 10.730,55 mg 100 g⁻¹ e 4.893,35 a 9.128,48 mg 100 g⁻¹, respectivamente. A partir desses resultados obtidos, sugere-se que a concentração de AOA possa estar fortemente relacionada com a cor do méis. Geralmente méis de melato são mais escuros e destacam-se pelo sabor forte característico quando comparado aos méis florais. Segundo Ball (2007) “quanto mais escuro é o mel, mais intenso é o sabor”.

A partir das Tabelas 23 e 24, foi observado que o ácido cítrico poderia ser utilizado como um AOA para discriminar as duas classes de méis, visto que, este ácido apresentou maiores concentrações em mel de

melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) quando comparado ao mel floral. Esse fato está de acordo com o que normalmente é relatado na literatura (SUÁREZ-LUQUE et al., 2002).

Uma característica em comum observada em ambas as classes de méis (floral e melato) foi a ausência dos ácidos fumárico e tartárico. Dessa maneira, com exceção dos ácidos fumárico e tartárico, todos os outros 12 AOA foram detectados e quantificados nos méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). Nas amostras de méis florais o ácido glutárico foi detectado e quantificado em apenas uma amostra, oriunda de Urupema, e o ácido maleico não detectado apenas na amostra oriunda de Lages, todos os demais foram quantificados.

O ácido acético, é o principal AOA que pode advir de uma fermentação dos méis. Nesse estudo, o ácido acético apresentou baixos teores em mel floral, variando de 13,68 a 58,37 mg 100 g⁻¹ para as amostras oriundas de Bom Retiro e São Joaquim, respectivamente. Quando comparado ao mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), os teores de ácido acético foram superiores, variando de 63,06 a 134,91 mg 100 g⁻¹ para as amostras oriundas de Lages e Bom Retiro, respectivamente.

Pode ser comum que méis de melato apresentem maiores teores de ácido acético (CAMPOS et al., 2000), uma vez que, a produção de méis de melato, diferencia-se da produção de mel floral, principalmente devido a etapa e/ ou processo de digestão de insetos sugadores de plantas, responsáveis pela liberação de exsudato (ou melato) e dessa maneira, pode ter influência nos elevados teores de ácido acético em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) quando comparado ao menores teores em mel floral.

Ressalta-se também que os méis (floral e melato) utilizados nesse estudo, são méis frescos e sem indícios de fermentação. Além disso, não há legislação que estabeleça teores mínimos e máximos para AOA em méis, principalmente para o ácido acético que pode ser formado a partir de uma fermentação indesejada. Somente é estabelecido pelo MAPA, que os méis não devam ter indícios de fermentação (BRASIL, 2000). Principalmente, para o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), apesar de apresentar maiores concentrações de AOA e também de ácido acético, quando comparado ao mel floral, os méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) do estado de Santa Catarina podem apresentar característica única, devido aos maiores teores de AOA reportados nesse estudo quando comparados aos trabalhos da literatura.

A presença de ácido fórmico nos méis pode ocorrer a partir da hidratação do 5-HMF com duas moléculas de água (CAVIA et al., 2007),

ou a elevada concentração do ácido fórmico nos méis, pode ser devido a sua utilização no tratamento aplicado nas colméias contra a infestação por *Varroa* que podem acumular-se na cera e em menor extensão, nos méis (BOGDANOV et al., 2002; MATO et al., 2003). Nesse estudo, em ambas as classes de méis, o ácido fórmico apresentou baixos teores, os quais variaram de 39,79 a 87,85 mg 100 g⁻¹ para o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e para o mel floral a concentração de ácido fórmico variou de 18,80 a 67,87 mg 100 g⁻¹.

Ainda sobre as discussões realizadas nas seções 6 e 7, foi observado que o mesmo ácido apresenta para a mesma classe de mel, na maioria das vezes, elevada variabilidade em sua concentração quando comparado as diferentes regiões geográficas. Porém, quando realizado a comparação, nesse caso, do mesmo ácido e da mesma região geográfica porém de classes de méis distintas, continua sendo observado elevada variabilidade na concentração do AOA. Por exemplo, o ácido cítrico apresentou concentração de 259,50 mg 100 g⁻¹ para o mel de melato de bracatinga de Lages e 244,02 mg 100 g⁻¹ para o mel de melato de bracatinga de São Joaquim. O mesmo ácido, apresentou concentração de 107,77 mg 100 g⁻¹ para a o mel floral de Lages e 505,84 mg 100 g⁻¹ para o mel floral de São Joaquim.

O ácido glucônico foi o AOA majoritário em ambas as classes de méis porém, em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) apresentou maiores concentrações quando comparado aos méis florais, uma vez que, a soma do teor de ácido glucônico foi de 30.264,29 e 27.731,01 mg 100 g⁻¹, respectivamente. A variabilidade da concentração do ácido glucônico também pode ser observada para amostras da mesma região geográfica, porém de diferentes classes de méis. Para o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) de Urubici e Urupema a concentração de ácido glucônico foi de 5.582,34 mg 100 g⁻¹ e 7.415,58 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Para as mesma cidades (regiões geográficas), porém para amostras de méis florais, a concentração de ácido glucônico foi de 8.711,98 mg 100 g⁻¹ e 5.449,52 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

Supõe-se que essas ocorrências possam advir, além das diferentes regiões geográficas, das condições meteorológicas de cada região em que as flores e/ou plantas, que são utilizadas pelas abelhas melíferas para produção de mel, estavam submetidas; das condições meteorológicas durante a maturação e período de colheita dos méis; da disponibilidade de nectar e/ou pólen ou exsudato.

Enfim, a composição e qualidade do mel tornam-se influenciadas, pelas condições do meio ambiente, espécies de abelhas envolvidas na sua produção, processamento, maturação, manipulação, embalagem e tempo de armazenamento (BERTONCELJ et al., 2007; DA SILVA et al., 2016; DOMINGUEZ et al., 2016; RIZELIO et al., 2012a). Assim, alguns componentes presentes nos méis vêm das plantas, outros são adicionados por abelhas, e outros ainda são oriundos de reações bioquímicas ocorridas durante a maturação (IGLESIAS et al., 2004).

9 INFLUÊNCIA DO PERÍODO DE COLHEITA E CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS NA CONCENTRAÇÃO DOS AOA EM MÉIS DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.) e FLORAL

Por meio da Tabela 4 foi observado que a disponibilidade de mel floral produzido por abelhas do gênero *Apis mellifera* ocorre, praticamente, durante todo o ano de 2016, visto que, as coletas foram realizadas dos meses de janeiro a novembro de 2016. Ainda, foi observado que para a mesma matriz, tem-se um intervalo elevado nos períodos de coleta, por exemplo, o mel floral oriundo da cidade de Urubici foi coletado no mês de novembro e o mel floral oriundo da cidade de Urupema, coletado nos meses de janeiro e junho. Porém, em relação as coletas das amostras de méis de melato de bracatinga (Tabela 4) também produzidos pelas abelhas do gênero *Apis mellifera*, foi observado que os períodos entre as coletas das amostras foram menores, sendo entre os meses de abril a junho de 2016.

Dessa maneira, pela alta variabilidade entre os períodos de coletas dos méis florais e pela inexistência de coletas dessas amostras nos mesmos meses, inviabilizou-se a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho em relação ao período de colheita e condições meteorológicas que pudessem evidenciar alguma influência na concentração de AOA nas amostras de méis florais.

As amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) coletadas exatamente nos mesmos períodos, maio e junho, porém pertencentes a regiões geográficas diferentes, ou seja, Lages e Urubici (maio); São Joaquim e Bom Retiro (junho) (Consultar Apêndice H), também apresentaram variabilidade na concentração da maioria dos AOA nos méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). Por exemplo, o ácido maleico presente nos méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) oriundos das cidades de Lages e Urubici,

ambos coletados nos meses de abril e maio, apresentaram concentração de 40,94 mg 100 g⁻¹ e 53,99 mg 100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 23). E para os méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) coletados no mês de Junho nas cidades de São Joaquim e Bom Retiro, a concentração de ácido maleico foi de 41,64 mg 100 g⁻¹ e 79,10 mg 100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 23).

Essa variabilidade, conforme descrita no parágrafo acima, foi observada em praticamente todos os AOA que foram quantificados nos méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), com exceção do ácido glicólico (Tabela 23), que manteve concentrações muito próximas para os méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) coletados nas cidades de Lages e Urubici, ambos no mes de maio, apresentando concentrações de 90,08 e 100,64 mg 100 g⁻¹ de ácido glicólico, respectivamente. O mesmo aconteceu para os méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), coletados no mês de junho nas cidades de São Joaquim e Bom Retiro, apresentando pequena variação na concentração de ácido glicólico, as quais foram de 97,85 e 98,06 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

Segundo dados disponibilizados pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM), as temperaturas (mínima, média e máxima) e a precipitação (soma da chuva, neve e granizo em 24 h) referentes aos meses de coleta dos méis (floral e melato) do ano de 2016, apresentaram pouca variação quando comparados as mesmas épocas de colheita. Para maiores informações, consultar Apêndices G e H.

Dessa maneira, ficou inviabilizado a justificativa da grande variabilidade da concentração dos AOA presentes nos méis de melato de bracatinga, por meio dos dados meteorológicos e épocas de colheita.

10 CONCLUSÕES

O *software* Peakmaster[®] foi uma ferramenta importante no desenvolvimento do método proposto pois, apresentou separação eletroforética dos AOA em tempo inferior a 10 minutos além de, possibilitar a escolha

- Dos 14 AOA: maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, succínico, glutárico, acético e propiônico que integraram os analitos de interesse no método proposto
- Do co-íon e contra-íon: ácido ftálico na concentração de 20 mmol L⁻¹ e TRIS na concentração de 14 mmol L⁻¹, respectivamente, que integraram o BGE
- Do padrão interno: ácido glioxílico
- Dos parâmetros analíticos: tensão de separação (15kV), dimensões do capilar (L_{tot} 60,5 cm e L_{eff} 52 cm), polaridade na injeção (negativa) e modo de detecção (indireto)

A partir das simulações pelo Peakmaster[®] foi evitado que na prática ocorresse a utilização exagerada e/ou desnecessária de reagentes e padrões, dessa forma, minimizando a geração de resíduos químicos além de, simular eletroferogramas com resultados muitos similares aos obtidos experimentalmente.

Apesar da maioria dos parâmetros serem escolhidos por meio de simulações, as escolhas das concentrações de CTAB e de CaCl₂ foram realizadas experimentalmente, porém estas, apresentaram pouca contribuição para a geração de resíduos químicos, visto que, foram utilizados volumes na ordem de nanolitros.

O método proposto associado à técnica de eletroforese capilar demonstrou potencialidade na separação simultânea de 14 AOA, visto que, apresentou resultados analíticos confiáveis durante a verificação dos parâmetros de validação: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, robustez, além de não ser evidenciado efeito de matriz.

Após a validação, o método pode ser aplicado na determinação de AOA em amostras de méis de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e florais das cidades de Lages, São Joaquim, Urupema, Urubici e Bom Retiro.

Em todas as amostras de méis (floral e melato) analisadas, o ácido glucônico foi majoritariamente determinado, porém em mel de melato de

bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) o ácido glucônico apresentou concentrações superiores quando comparado ao mel floral.

Os ácidos malônico e glicólico foram quantificados pela primeira vez em mel de melato e mel floral e o ácido láctico quantificado pela primeira vez em mel de melato, sendo que, nesse estudo o ácido láctico foi o segundo ácido em maior concentração em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.).

A elevada variabilidade na concentração de AOA nas amostras de méis (floral e melato) pode estar relacionada, principalmente, com as diferentes regiões geográficas, além das diferentes épocas de colheitas dos méis.

O método desenvolvido e validado tem potencialidade para ser aplicado na determinação de AOA em outras matrizes alimentares, por exemplo, sucos, frutas, produtos fermentados (vinhos, cervejas, queijos, pães, iogurtes), produtos embutidos fermentados (salame de diversos tipos, linguiça, pepperoni), entre outros.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São pertinentes diversas sugestões para estudos futuros. Em um contexto geral, é interessante aumentar a aplicabilidade do método validado, ou seja $n > 5$, para viabilizar a utilização de análises quimiométricas e, dessa maneira, o ácido cítrico poderia ser utilizado como um parâmetro de discriminação entre os méis de melato e florais.

Avaliar a presença dos AOA no pólen e/ou exsudato, conforme a disponibilidade dessas matérias-primas e, por meio de análises quimiométricas correlacionar a presença dos AOA determinados nas matérias-primas com os AOA determinados nos méis, para elucidar a variabilidade dos resultados obtidos nesse trabalho, bem como, a origem e/ou formação de AOA ainda desconhecidos.

Avaliar o parâmetro incerteza de medição levando em consideração as fontes de incerteza:

- Curvas de calibração: grau de pureza dos padrões, massa e volume no preparo das soluções estoque e as diluições no preparo das curvas de calibração;
- Precisão intra-ensaio ou repetibilidade;
- Precisão inter-ensaio ou precisão intermediária;
- Exatidão;
- Preparo de amostras: massa da amostra, volume do recipiente (balão volumétrico, eppendorf) e diluições.

Para verificar quais das fontes relatadas acima podem ter maior contribuição para a incerteza do método proposto.

No preparo dos pontos da curva de calibração, considerar que a faixa de concentração do ácido glucônico inicie em maiores teores, uma vez que, o ácido glucônico é majoritário nos méis. Então, uma faixa de concentração inicial superior a 40 mg L^{-1} , por exemplo, poderia ser uma maneira de evitar diversas diluições durante a análise das amostras, as quais, foram necessárias nesse estudo.

11 REFERÊNCIAS

ABRAMOVIC, H. et al. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**, v. 19, p. 1086–1090, 2008.

ALQARNI, A. S. et al. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 618–625, 2014.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 38–49, 2016.

ANVISA. Ministério da Saúde (MS) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 2017, p. 22, 2017.

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, p. Appendix 1-17, 2012.

APARNA, A. R.; RAJALAKSHMI, D. Honey—its characteristics, sensory aspects, and applications. **Food Reviews International**, v. 15, n. 4, p. 455–471, 1999.

AZEVEDO, M. S. et al. Screening and determination of aliphatic organic acids in commercial Brazilian sugarcane spirits employing a new method involving capillary electrophoresis and a semi-permanent adsorbed polymer coating. **Food Research International**, v. 60, p. 123–130, 2014.

AZEVEDO, M. S. et al. Proteome comparison for discrimination between honeydew and floral honeys from botanical specie *Mimosa scabrella* Benthham by principal componet analysis. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 2017.

BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 727–733, 2009.

BENTABOL MANZANARES, A. et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 664–672, 2011.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822–828, 2007.

BILANDŽIĆ, N. et al. Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. **Food Chemistry**, v. 234, p. 245–253, nov. 2017.

BOGDANOV, S. et al. Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. **Apidologie**, v. 33, p. 399–409, 2002.

BOGDANOV, S. et al. Honey for Nutrition and Health: a Review. **American Journal of the College of Nutrition**, v. 27, n. January, p. 677–689, 2008.

BRASIL, MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 2000.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003

BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**, Brasília (DF): Mapa/ACS, 2011.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, n. 1–2, p. 93–106, 1998.

BRUDZYNSKI, K.; SJAARDA, C.; MALDONADO-ALVAREZ, L. A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72897, 30 ago. 2013.

CAMARGO, R. C. R. DE; PEREIRA, F. DE M.; LOPES., M. T. DO R. Produção de mel. In: **Sistemas de Produção**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 138p. 2002.

CAMPOS, G. et al. Substâncias voláteis em mel floral e mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 18–22, 2000.

CAMPOS, G. et al. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 1–5, 2003.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; PÉREZ-COELLO, M. S. Volatile Composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4809–4813, 2006.

CAVIA, M. M. et al. Evolution of acidity of honeys from continental climates : Influence of induced granulation. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1728–1733, 2007.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M. C.; MOTTO, A. The correlation between water activity and % moisture in honey : Fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 3, p. 287–292, 2006.

CHUA, L. S. Untargeted Small Metabolite Identification from Thermally Treated Tualang Honey. **Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 9, n. 12, p. 1201–1205, 2015.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 11, n. 1, p. 47–52, jan. 1941.

CODEX ALIMENTARIUS. **Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods**, 2001. (Nota técnica).

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

CONTI, M. E. et al. Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. **Chem Cent J**, v. 1, p. 14, 2007.

COSTA, A. C. O. **Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)**. 2009. 294 p. Tese. Programa de Pós Graduação em Química da Universidade de São Paulo. 298p. 2009.

DA SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess

linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 23–35, 2005.

DE SOUZA, S. V. CARVALHO. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais. 296p. 2007.

DELLA BETTA, F. et al. A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. **Meat Science**, v. 119, p. 62–68, 2016.

DELLA BETTA, F. **Desenvolvimento e validação de métodos rápidos por eletroforese capilar aplicados à análise de produtos cárneos e cerveja**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. 161 p. 2016.

DOMINGUEZ, M. A. et al. Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 1–4, 2016.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, p. 159–178, jun. 1951.

EL-KASED, R. F. Natural antibacterial remedy for respiratory tract infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 3, p. 270–274, mar. 2016.

ESCRICHE, I. et al. Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. **Food Chemistry**, v. 226, p. 61–68, 2017.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2014.

FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N. DE; OLIVEIRA, M. A. L. DE. 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.

FEÁS, X. et al. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3462–3470, 2010.

FLORES, P.; HELLÍN, P.; FENOLL, J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1049–1054, maio 2012.

- FRINK, L. A.; ARMSTRONG, D. W. The utilisation of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 205, p. 23–27, 2016.
- GALLI, V. et al. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. **Electrophoresis**, v. 24, n. 1213, p. 1951–1981, 2003.
- GALLI, V.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, n. 1–2, p. 299–304, abr. 2004.
- GRUBBS, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1–21, 1969.
- GÜZEL-SEYDİM, Z. B. et al. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 35–43, fev. 2000.
- HAROUN, M. I. et al. Organic Acid Profiles and Contents of Turkish Honeydew and Floral honeys. **International Conference on Environment, Agriculture and Food Sciences**, p. 55–58, 2012.
- IGLESIAS, M. T. et al. Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral honeys. Application to honeys from a Small Geographic Area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 84–89, 2004.
- INMETRO (Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, Rev. 5, Ago. 2016.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Norma Brasileira: ABNT NBR ISO/IEC 17025**, 2005.
- 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.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.
- JONATHAN, W.; WHITE, J. Honey. **Advances in Food Research**, v. 24, p. 287–374, 1978.
- KADRI, S. M.; ZALUSKI, R.; ORSI, R. DE O. Nutritional and mineral

contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. **Food Chemistry**, v. 218, p. 237–241, 2017.

KALAYCIOĞLU, Z. et al. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 402–408, 2017.

KASKONIENE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 801–807, 2010.

KASSIM, M. et al. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 650–659, set. 2010.

KAYGUSUZ, H. et al. Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 273–279, 2016.

KELLY, J. D.; PETISCO, C.; DOWNEY, G. Potential near infrared transmittance spectroscopy to detect adulteration of Irish honey by beet invert syrup and high fructose corn syrup. **Journal Near Infrared Spectroscopy**, v. 14, p. 139–146, 2006.

KHALIL, M. I. et al. Cardioprotective effects of tualang honey: Amelioration of cholesterol and cardiac enzymes levels. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2015.

KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U.; BUCHBERGER, W. Separation of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect UV and conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 19, n. 14, p. 2459–2464, 1998.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 1543p. 2008.

LEÓN-RUIZ, V. et al. Vitamin C and Sugar Levels as Simple Markers for Discriminating Spanish Honey Sources. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. 356–361, 2011.

LUKASIEWICZ, M.; KOWALSKI, S.; MAKAREWICZ, M. Antimicrobial and antioxidant activity of selected Polish herb honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 547–553, 2015.

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.

1, n. 2, p. 154–160, 2011.

MANTILLA, S. P. S. et al. ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA APLICADA EM MEL DE ABELHAS (*Apis mellifera*): UMA REVISÃO. **Colloquium Agrariae**, v. 8, n. 2, p. 75–84, 2012.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 844–852, 2011.

MARENDA, T. A. et al. Desenvolvimento de um sistema para classificação do mel em floral e melato por parâmetros físico químicos combinados com redes neurais artificiais. **Evidência**, v. 11, n. 1, p. 61–74, 2011.

MATO, I. et al. Enzymatic Determination of Total D -Gluconic Acid in Honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3550–3553, 1997.

MATO, I. et al. Significance of Nonaromatic Organic Acids in Honey. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 12, p. 2371–2376, 2003.

MATO, I. et al. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1541–1550, 2006a.

MATO, I. et al. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, n. 2, p. 190–197, abr. 2006b.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga, Mimosa scrabella Bentham: cultivo, manejo e usos da espécie**. Florianópolis (SC): Epagri. 365p, 2014.

MENDES, C. D. G.; MESQUITA, L. X. DE. As Análises De Mel : Revisão the Analysis of Meis : Review. p. 7–14, 2009.

MENDONÇA, K. E. A. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 513–521, 2008.

MERCOSUL. **Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”**. 1999.

MOREIRA, P. A. et al. Genetic diversity and mating system of bracatinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern

- Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 83, n. 2, p. 245–256, 2011.
- MOREIRA, R. F. A. .; MARIA, C. A. B. Glicídeos no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516–525, 2001.
- NASUTI, C. et al. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. **Nutrition Research**, v. 26, n. 3, p. 130–137, 2006.
- NAVARRETE, M. et al. Direct determination of aliphatic acids in honey by coelectroosmotic capillary zone electrophoresis. **Journal of Apicultural**, v. 44, n. 2, p. 65–70, 2005.
- NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, M. et al. Quality control of fruit juices by using organic acids determined by capillary zone electrophoresis with poly(vinyl alcohol)-coated bubble cell capillaries. **Food Chemistry**, v. 188, p. 596–603, 2015.
- NAYIK, G. et al. Discrimination of High Altitude Indian honey by chemometric approach according to their antioxidant properties and macro minerals. **Journal of the Saudi Society of ...**, 2016.
- NOZAL, M. J. et al. HPLC Determination of Low Molecular Weight Organic Acids in Honey with Series-Coupled Ion-Exclusion Columns. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 8, p. 1231–1253, 2003a.
- NOZAL, M. J. et al. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. **Apidologie**, v. 34, n. 2, p. 181–188, mar. 2003b.
- OHMENHAEUSER, M. et al. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. **Analytical Ch**, p. 1–9, 2013.
- OLOFSSON, T. C.; VÁSQUEZ, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. **Current Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 356–363, 2008.
- OMAR, M. M. A.; ELBASHIR, A. A.; SCHMITZ, O. J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. **Food Chemistry**, v. 214, p. 300–307, 2017.
- PAPAGIANNI, M. **Organic Acids**. Second edition, v.1. Elsevier, 2011.
- PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2–3, p. 216–224, 2007.

- PITA-CALVO, C.; VÁZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 79–87, jan. 2017.
- PRICA, N. et al. Moisture and Acidity As Indicators of the Quality of Honey Originating From Vojvodina Region. **Arhiv veterinarske medicine**, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2014.
- PRIMORAC, L. et al. COMPARISON OF THE CROATIAN AND MACEDONIAN HONEYDEW HONEY USPOREDBA HRVATSKOG I MAKEDONSKOG MEDLJKOVCA. **Journal of Central European Agriculture**, v. 10, n. 3, p. 263–269, 2009.
- REVELL, L. E.; MORRIS, B.; MANLEY-HARRIS, M. Analysis of volatile compounds in New Zealand unifloral honeys by SPME–GC–MS and chemometric-based classification of floral source. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 8, n. 2, p. 81–91, jun. 2014.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201–205, 2007.
- RIBEIRO, F. A. DE L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimular figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.
- RIZELIO, V. M. et al. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: A possible method for geographic origin discrimination. **Talanta**, v. 99, p. 450–456, 2012a.
- RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples (a). **Talanta**, v. 93, p. 62–66, 2012b.
- SAKR, M. R.; DALLABRIDA, V. R. Produtos de Santa Catarina com identidade territorial. **Revista de Política Agrícola**, p. 102–113, 2015.
- SCHLABITZ, C.; FERREIRA DA SILVA, S. A.; VOLKEN DE SOUZA, C. F. Avaliação De Parâmetros Físico-Químicos E Microbiológicos Em Mel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, 2010.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for

Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SILVA, F. S. M. F.; SILVA, S. M.; NETTO, A. P. C. Aplicação do índice de Kirkwood para diferenciar mel floral e de melato oriundos do município de Bom Retiro (SC). **REVISTA AGRARIAN**, p. 244–250, 2011.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 8. ed. ed. [s.l.] Iowa: State University Press, 1989.

SUÁREZ-LUQUE, S. et al. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 955, n. 2, p. 207–214, 2002.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1995.

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

TENORE, G. C. et al. Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1955–1961, 2012.

TEZCAN, F. et al. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 50, n. 1, p. 33–40, 2011.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TRAVASSOS LEMOS, M. A.; CASSELLA, R. J.; DE JESUS, D. P. A simple analytical method for determining inorganic anions and formate in virgin olive oils by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Control**, v. 57, p. 327–332, 2015.

VICTORITA, B. et al. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Sugars in Transylvanian Honeydew. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. Animal Science and Biotechnologies**, v. 65, p. 229–232, 2008.

VITALI, L. et al. Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 106, p. 181–185, 2013.

VÖLGYI, G. et al. Potentiometric and spectrophotometric pK_adetermination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, n. 2, p. 418–428, 2007.

WHATLEY, H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**, p. 21–58, 2001.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. 378p. 2005.

WILLIAMS, R. L. et al. Use of quasi-equimolar, closely-spaced, poly-cation background electrolytes in capillary electrophoresis for the reduction of electromigration dispersion over a wide mobility range. **Journal of Chromatography A**, v. 814, n. 1–2, p. 199–204, 1998.

YIN, X. et al. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 830–841, 2015.

YOU DEN, W. J. .; STEINER, E. . Association of Official Analytical Chemistry. **Statistical manual of AOAC**, 1975.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2722–2726, jun. 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ELETROFORESE CAPILAR

Devido a fatores geométricos (grande área superficial interna comparada ao volume total), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica, controlando de forma eficiente o efeito joule. Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos elevados (30000 Volts) resultando em separações de alta eficiência e em menores tempos (TAVARES, 1995, 1997).

Um equipamento de CE consiste basicamente de um sistema de injeção, coluna capilar (usualmente de sílica fundida pois apresenta boa condutividade térmica e transparência na região do UV-vis) onde ocorre a separação, fonte de alta tensão, dois reservatórios que podem acomodar tanto o capilar e os eletrodos, detector e um sistema para obtenção e tratamento dos dados (LANDERS, 2008). Na ausência de um campo elétrico, o movimento dos íons é aleatório, porém, quando as espécies carregadas estão sob a ação do campo elétrico, movem-se numa distribuição menos aleatória resultando na separação. Íons carregados positivamente movem-se em direção ao cátodo (eletrodo de carga negativa) e íons carregados negativamente movem-se em direção ao ânodo (eletrodo de carga positiva)(WHATLEY, 2001).

Em CE as amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos (TAVARES, 1995). Na injeção eletrocinética a amostra é introduzida no capilar devido a uma variação de potencial que se forma ao longo do tubo. Como consequência, a quantidade de material injetado é uma função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e do eletrólito e da grandeza do EOF. No modo de injeção hidrodinâmica, a amostra é introduzida no capilar por meio de um gradiente de pressão (pressão positiva, vácuo, sifonagem) que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar, sendo assim, o volume injetado depende do tempo de injeção, dimensões do capilar e viscosidade da solução tampão (DA SILVA et al., 2007).

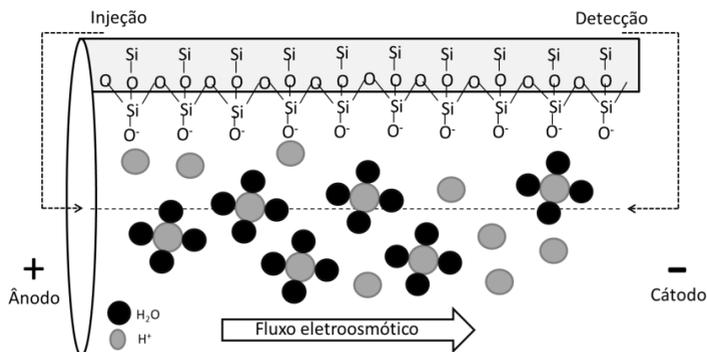
Diferentes sistemas de detecção, cada qual adequado para a aplicação requerida, podem ser utilizados em CE. Devido a maior aplicabilidade os detectores com absorção molecular na região ultravioleta/visível (UV-vis, 200 a 900 nm) são os mais utilizados no sistema de CE, uma vez que possuem baixo custo e atendem a uma

considerável gama de compostos (OMAR; ELBASHIR; SCHMITZ, 2017). Além disso a versatilidade desse detector permite que os compostos sejam detectados de forma direta ou indireta. A detecção por absorção direta é restrita a espécies que absorvam na região do UV-vis, ou seja, para analitos que possuem grupos cromóforos, a detecção é realizada pela medida da absorção dos íons quando esses passam pelo detector. Para compostos que apresentam baixa absorvidade molar ou que não possuem grupos cromóforos, a detecção por absorção na região do UV-vis é efetuada indiretamente. Nesse caso, um cromóforo é adicionado ao eletrólito e o detector recebe um sinal contínuo devido à presença deste composto. A detecção do analito é efetuada indiretamente pela diminuição da absorvância (ou sinal) do eletrólito devido ao deslocamento do ânion cromóforo do eletrólito pelo ânion do soluto, durante a passagem deste pelo detector (JAGER; TAVARES, 2001). Além do detector UV-vis, outros detectores podem ser utilizados em CE, sendo eles: índice de refração; condutividade; absorbância; fluorescência e espectrometria de massas.

A utilização de capilares de sílica fundida nas separações por EC introduziu um importante fenômeno denominado de EOF (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997). O EOF é consequência de uma interação entre a solução e a superfície interna do capilar, os grupos silanóis na superfície interna do capilar têm caráter ácido e, em contato com o meio aquoso (pH acima de 2), sofrem dissociação (forma ionizada), fazendo com que a carga da superfície interna do capilar torne-se negativamente carregada (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997; LANDERS, 2008) enquanto que os prótons H^+ provenientes da parede do capilar serão liberados e difundidos no seio da solução que preenche o capilar.

Quando a diferença de potencial é aplicada, estes cátions migram em direção ao cátodo juntamente com as moléculas de água que solvata todos estes íons, induzindo o aparecimento de um fluxo de líquido no capilar, denominado EOF, ilustrado na Figura 20. Dentro do tubo capilar, o EOF é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas (TAVARES, 1995).

Figura 20- Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.



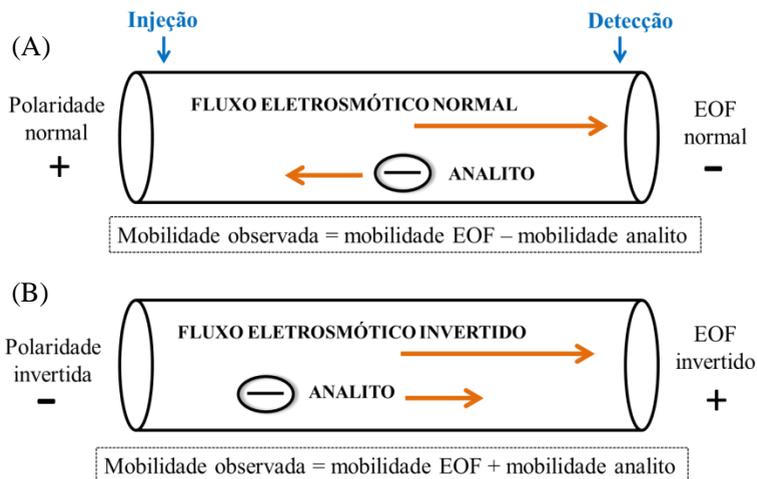
Fonte: Adaptado de Costa (2009).

Dessa forma, o EOF é responsável pela condução dos solutos na direção do detector, sem distinção de carga, permitindo assim a separação simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos com alta eficiência (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997; TAVARES, 1997).

Adicionalmente, a suscetibilidade do EOF a variações de pH requer que o tampão apresente constância no valor de pH além de baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, e baixa mobilidade para minimizar a geração de calor por efeito Joule. Além disso, a escolha do tampão está vinculada a considerações sobre a forma da banda, tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do soluto previnem distorções no perfil do pico eletroforético e minimizam o seu alargamento (TAVARES, 1997).

A presença do EOF impõe características intrínsecas nas separações de ânions por CE e os possíveis mecanismos de separação podem ser divididos em dois modos: contra-eletrosmótico e co-eletrosmótico (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997), conforme representado na Figura 21.

Figura 21- Representação esquemática dos modos de separação em CE. (A) contra-eletrosmótico e (B) co-eletrosmótico.



Fonte: Adaptado de Costa (2009) e Colombara, Tavares e Massarro (1997).

Em (A), a amostra é introduzida no capilar pela extremidade em que o eletrodo encontra-se carregado positivamente (ânodo) e a separação é conduzida sob fluxo eletrosmótico normal ou modo contra-eletrosmótico, ou seja, o analito (ânion) migra no sentido oposto ao EOF, o qual é responsável por “carregá-lo” ao detector, uma vez que a mobilidade do EOF será maior que a mobilidade do ânion (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997).

Em (B) a amostra é introduzida no capilar pela extremidade em que o eletrodo encontra-se carregado negativamente (cátodo). Nesse caso, a polaridade e o EOF foram invertidos e nessa condição, ambos migram na mesma direção, ou seja, no modo co-eletrosmótico, possibilitando a detecção de todos os componentes da mistura em um tempo apreciavelmente curto, visto que, as mobilidades vetoriais são somadas (COLOMBARA; TAVARES; MASSARRO, 1997).

APÊNDICE B- Influência dos parâmetros analíticos avaliados em relação a área corrigida para os ácidos orgânicos alifáticos.

Ácido	Área Corrigida													
	Tensão		pH		Temperatura		Pressão		Comprimento de Onda		Tempo de Lavagem		Tempo de Injeção	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
1	0,026	0,003	-0,019	-0,010	-0,052	-0,038	-0,014	-0,001	0,360	0,113	-0,010	0,030	-0,019	-0,002
2	-0,006	-0,004	0,070	-0,009	-0,368	-0,121	-0,002	0,002	-0,046	0,012	0,001	0,001	-0,059	0,005
3	0,021	-0,005	0,046	-0,001	-0,096	-0,034	0,013	0,010	0,346	0,114	0,011	0,007	0,012	0,003
4	-0,016	-0,011	0,028	-0,002	-0,500	-0,169	-0,013	0,001	-0,049	-0,002	0,002	0,003	-0,021	0,003
5	0,003	-0,048	0,012	-0,077	-0,332	-0,199	-0,013	-0,028	-0,011	-0,031	0,022	-0,047	0,000	-0,040
6	-0,056	-0,015	0,080	0,018	-0,527	-0,176	-0,005	0,000	-0,072	0,005	-0,007	0,004	-0,065	-0,004
7	-0,019	-0,011	0,044	0,007	-0,467	-0,244	-0,020	0,006	-0,061	-0,007	-0,008	0,012	-0,042	-0,003
8	-0,030	-0,006	0,069	-0,050	-0,393	-0,172	-0,006	-0,008	-0,046	-0,012	0,006	0,005	-0,037	0,000
9	-0,024	-0,001	0,027	0,100	-0,355	-0,301	-0,029	-0,015	-0,020	0,006	0,004	0,016	0,014	0,042
10	-0,027	0,017	0,003	0,101	-0,457	-0,946	-0,022	0,036	-0,028	-0,009	0,034	0,069	-0,019	-0,016
11	-0,051	0,004	0,125	0,065	-0,429	-0,235	-0,026	0,016	-0,077	0,016	0,016	0,012	-0,057	0,002
12	-0,014	0,009	0,049	-0,005	-0,477	-0,179	-0,013	0,008	-0,102	0,005	0,037	-0,009	-0,039	-0,003
13	0,000	-0,038	0,054	0,189	-0,372	-0,229	0,016	0,070	-0,076	0,050	0,014	0,068	-0,025	-0,050
14	0,013	0,025	0,066	0,047	-0,413	-0,105	0,011	0,025	-0,085	-0,010	0,024	-0,008	-0,038	0,006

Legenda: 1- maleico; 2- malônico; 3- fumárico; 4- tartárico; 5- fórmico; 6- cítrico; 7- málico; 8- glicólico; 9- láctico; 10- glucônico; 11- succínico; 12- glutárico; 13- acético; 14- propiônico; A- curva em solução aquosa; M- curva em matriz.

APÊNDICE C- Influência dos parâmetros analíticos avaliados em relação a área corrigida para os ácidos orgânicos alifáticos.

Ácido	Tempo corrigido													
	Tensão		pH		Temperatura		Pressão		Comprimento de Onda		Tempo de Lavagem		Tempo de Injeção	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
1	0,000	-0,001	0,005	0,006	0,000	0,000	0,001	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,001	-0,002	0,000
2	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,001
3	0,000	-0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,000
4	0,000	-0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,000
5	0,000	-0,001	-0,004	-0,004	0,000	-0,001	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,000	0,000	0,001	0,000
6	0,000	-0,001	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001
7	0,000	-0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001
8	-0,001	-0,002	-0,001	0,000	0,000	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
9	-0,001	-0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,003
10	-0,001	-0,002	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,002	0,004
11	-0,002	-0,003	0,003	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,000	-0,001	0,000	0,003	0,004
12	-0,003	-0,004	0,005	0,007	-0,001	-0,001	0,000	0,000	-0,001	0,000	-0,001	0,000	0,003	0,004
13	-0,004	-0,005	0,008	0,011	-0,001	-0,001	0,000	0,000	-0,001	0,000	-0,001	0,000	0,003	0,005
14	-0,004	-0,005	0,009	0,011	-0,001	-0,001	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,001	0,000	0,003	0,005

Legenda: 1- maleico; 2- malônico; 3- fumárico; 4- tartárico; 5- fórmico; 6- cítrico; 7- málico; 8- glicólico; 9- láctico; 10- glucônico; 11- succínico; 12- glutárico; 13- acético; 14- propiônico; A- curva em solução aquosa; M- curva em matriz.

APÊNDICE D- Influência dos parâmetros analíticos avaliados em relação a concentração para os ácidos orgânicos alifáticos.

Ácido	Concentração													
	Tensão		pH		Temperatura		Pressão		Comprimento de Onda		Tempo de Lavagem		Tempo de Injeção	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
1	0,013	0,001	-0,009	-0,005	0,010	-0,003	-0,007	0,000	0,177	0,055	-0,005	0,015	-0,010	-0,001
2	-0,001	-0,001	0,014	-0,002	0,004	0,001	0,000	0,000	-0,009	0,002	0,000	0,000	-0,012	0,001
3	0,010	-0,002	0,023	0,000	0,000	0,001	0,006	0,005	0,170	0,056	0,006	0,004	0,006	0,001
4	-0,002	-0,002	0,004	0,000	0,003	-0,001	-0,002	0,000	-0,008	0,000	0,000	0,001	-0,003	0,000
5	0,001	-0,015	0,004	-0,025	-0,004	-0,020	-0,004	-0,009	-0,004	-0,010	0,007	-0,015	0,000	-0,013
6	-0,008	-0,002	0,012	0,003	-0,001	0,000	-0,001	0,000	-0,011	0,001	-0,001	0,001	-0,010	-0,001
7	-0,003	-0,002	0,007	0,001	0,004	0,001	-0,003	0,001	-0,010	-0,001	-0,001	0,002	-0,007	-0,001
8	-0,007	-0,001	0,015	-0,011	-0,001	-0,003	-0,001	-0,002	-0,010	-0,003	0,001	0,001	-0,008	0,000
9	-0,006	0,000	0,006	0,024	0,000	0,006	-0,007	-0,004	-0,005	0,001	0,001	0,004	0,003	0,010
10	-0,006	0,004	0,001	0,021	-0,002	-0,009	-0,005	0,008	-0,006	-0,002	0,007	0,014	-0,004	-0,003
11	-0,010	0,001	0,023	0,012	0,001	0,000	-0,005	0,003	-0,014	0,003	0,003	0,002	-0,011	0,000
12	-0,002	0,002	0,009	-0,001	0,000	-0,002	-0,002	0,001	-0,018	0,001	0,007	-0,002	-0,007	-0,001
13	0,000	-0,009	0,013	0,046	-0,003	-0,017	0,004	0,017	-0,019	0,012	0,004	0,017	-0,006	-0,012
14	0,003	0,006	0,015	0,011	-0,008	0,002	0,002	0,006	-0,020	-0,002	0,006	-0,002	-0,009	0,001

Legenda: 1- maleico; 2- malônico; 3- fumárico; 4- tartárico; 5- fórmico; 6- cítrico; 7- málico; 8- glicólico; 9- lático; 10- glucônico; 11- succínico; 12- glutárico; 13- acético; 14- propiônico; A- curva em solução aquosa; M- curva em matriz.

APÊNDICE E- Influência dos parâmetros analíticos avaliados em relação a simetria para os ácidos orgânicos alifáticos.

Ácido	Simetria													
	Tensão		pH		Temperatura		Pressão		Comprimento de Onda		Tempo de Lavagem		Tempo de Injeção	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
1	0,050	0,029	-0,033	-0,011	0,009	-0,040	-0,010	-0,114	0,443	0,208	0,032	0,091	-0,097	-0,004
2	0,018	-0,009	0,020	0,049	0,001	-0,004	0,004	-0,012	0,223	0,099	0,005	-0,003	-0,062	-0,009
3	-0,005	-0,010	-0,002	-0,042	-0,004	-0,005	0,008	-0,030	0,079	0,023	-0,021	0,022	-0,051	0,010
4	0,000	-0,007	0,004	-0,003	0,001	0,005	0,009	0,004	0,005	0,014	-0,004	0,005	0,001	-0,005
5	-0,004	0,125	-0,250	-0,153	0,006	0,102	0,005	0,114	-0,231	-0,135	0,001	0,109	0,016	0,072
6	0,001	0,005	-0,023	-0,011	0,003	0,002	0,001	0,002	-0,084	-0,088	0,005	0,001	0,005	-0,009
7	-0,008	-0,008	-0,010	0,022	-0,004	0,010	0,007	0,002	-0,201	-0,140	0,002	-0,001	0,038	0,005
8	-0,006	0,013	-0,010	0,072	0,004	-0,003	0,004	0,020	-0,309	-0,286	0,010	0,011	0,047	0,031
9	-0,011	-0,006	-0,037	-0,091	-0,015	-0,074	-0,004	0,009	-0,291	-0,224	0,020	0,033	0,022	-0,008
10	-0,013	-0,014	0,001	-0,023	0,003	-0,019	-0,007	-0,004	-0,370	-0,500	0,003	0,003	0,040	0,048
11	-0,008	-0,011	-0,023	-0,007	-0,003	0,000	0,002	-0,005	-0,461	-0,405	-0,002	0,007	0,043	0,015
12	-0,007	-0,013	-0,013	-0,002	-0,007	-0,012	-0,005	-0,009	-0,491	-0,424	-0,003	-0,004	0,041	0,016
13	-0,015	0,097	-0,011	0,001	-0,001	0,081	-0,007	-0,105	-0,564	-0,637	0,001	-0,077	0,008	0,133
14	-0,009	-0,036	-0,014	0,072	0,003	0,009	-0,002	0,028	-0,511	-0,575	0,003	-0,046	0,024	-0,028

Legenda: 1- maleico; 2- malônico; 3- fumárico; 4- tartárico; 5- fórmico; 6- cítrico; 7- málico; 8- glicólico; 9- lático; 10- glucônico; 11- succínico; 12- glutárico; 13- acético; 14- propiônico; A- curva em solução aquosa; M- curva em matriz.

APÊNDICE F- Influência dos parâmetros analíticos avaliados em relação a resolução para os ácidos orgânicos alifáticos.

Ácido	Resolução													
	Tensão		pH		Temperatura		Pressão		Comprimento de Onda		Tempo de Lavagem		Tempo de Injeção	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
1	0,965	0,071	-1,070	-0,127	0,997	-0,084	-0,962	-0,090	1,077	0,000	-0,944	0,156	-0,983	0,017
2	-0,105	0,022	-0,179	0,123	0,037	-0,025	-0,001	-0,010	-0,026	0,057	-0,018	0,001	-0,021	0,000
3	0,025	0,012	0,019	0,038	0,020	0,039	0,027	-0,058	0,026	0,053	-0,039	0,024	-0,040	0,008
4	0,022	0,063	-0,122	-0,124	0,038	0,057	-0,009	0,036	-0,028	0,015	-0,022	0,055	0,052	0,079
5	-0,037	-0,411	-0,054	0,310	0,002	-0,512	0,016	-0,437	-0,076	0,297	0,014	-0,404	-0,040	0,266
6	-0,083	-0,525	-0,075	0,621	-0,095	-0,613	0,051	-0,614	-0,050	0,597	0,042	-0,564	-0,025	0,647
7	-0,021	-0,483	-0,029	0,437	0,037	-0,595	0,036	-0,436	-0,048	0,527	0,048	-0,418	-0,042	0,582
8	0,057	-0,960	0,035	0,772	-0,013	-0,962	0,026	-0,941	0,007	0,921	0,038	-0,980	0,011	0,904
9	0,010	-0,537	-0,017	0,561	0,006	-0,518	0,002	-0,531	-0,006	0,553	-0,016	-0,511	0,061	0,606
10	0,028	-0,246	0,049	0,172	0,018	-0,199	0,039	-0,208	-0,035	0,245	0,037	-0,271	0,007	0,240
11	0,006	-1,503	-0,032	1,475	0,001	-1,476	-0,002	-1,472	0,055	1,534	-0,047	-1,472	0,011	1,485
12	-0,007	-0,542	-0,090	0,460	0,044	-0,480	-0,010	-0,617	0,010	0,513	0,006	-0,645	0,031	0,532
13	-0,018	-0,521	0,041	0,615	0,027	-0,490	0,020	-0,498	0,013	0,545	-0,026	-0,463	0,039	0,431
14	0,763	-0,677	0,794	0,918	-0,623	-0,544	0,788	-0,739	-0,595	0,635	-0,746	-0,587	-0,629	0,596

APÊNDICE G– Dados meteorológicos referentes aos meses de coleta de mel floral e localização geográfica das cidades de Lages, São Joaquim Urubici, Uupema e Bom Retiro do estado de Santa Catarina.

Mistura	Local	Mês de coleta	Temperatura (mensal)*			Precipitação* (soma mensal)	Localização geográfica*
			Mín.	Méd.	Máx.		
1	Lages	Setembro	2,3	13,4	26,6	107,9	Altitude: 937 m Latitude: 27°48'33" Longitude: 50°19'42"
		Novembro	5,3	17,3	28,8	73,8	
2	São Joaquim	Agosto	-2,0	10,7	25,0	99,0	Altitude: 1376m Latitude: 28°16'35" Longitude: 49°56'02"
		Outubro	1,8	12,8	25,0	216,2	
3	Urubici	Novembro	2,5	13,3	24,4	72,0	Altitude: 1592 m Latitude: 28°04'01" Longitude: 49°38'24"
4	Urupema	Janeiro	n.d	18,1	n.d	94,2	Altitude: 1315 m Latitude: 27°57'45" Longitude: 49°53'11"
		Junho	n.d	6,3	n.d	31,4	
5	Bom Retiro	Abril	n.d	n.d	n.d	217,0	Altitude: 865 m Latitude: 27°49'01" Longitude: 49°36'45"

Legenda: Mín - Mínima; Méd - Média; Máx - Máxima; n.d – não disponível no banco de dados.

Fonte: CIRAM*

APÊNDICE H– Dados meteorológicos referentes aos meses de coleta de mel de melato de bracatinga e localização geográfica das cidades de Lages, São Joaquim Urubici, Uupema e Bom Retiro do estado de Santa Catarina.

Mistura	Local	Mês de coleta	Temperatura (mensal)*			Precipitação* (soma mensal)	Localização geográfica*
			Mín.	Méd.	Máx.		
1	Lages	Abril	-0,7	18,6	30,8	136,8	Altitude: 937 m Latitude: 27°48'33" Longitude: 50°19'42"
		Maio	0,3	12,2	22,2	120,6	Altitude: 1376 m Latitude: 28°16'35" Longitude: 49°56'02"
2	São Joaquim	Junho	-7,0	6,9	19,2	13,6	Altitude: 1592 m Latitude: 28°04'01" Longitude: 49°38'24"
3	Urubici	Maio	-0,1	9,3	17,1	121,4	Altitude: 1315 m Latitude: 27°57'45" Longitude: 49°53'11"
4	Urupema	Abril	n.d	15,8	n.d	153,6	Altitude: 865 m Latitude: 27°49'01" Longitude: 49°36'45"
		Maio	n.d	9,7	n.d	128,0	
5	Bom Retiro	Junho	n.d	n.d	n.d	40,2	

Legenda: Mín - Mínima; Méd - Média; Máx - Máxima; n.d – não disponível no banco de dados.

Fonte: CIRAM.

