



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Fábio Zacouteguy Ugalde

Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar

Florianópolis
2020

Fábio Zacouteguy Ugalde

Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar

Dissertação submetida ao Programa de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos
Orientador: Prof^º. Dr^ª. Ana Carolina de Oliveira Costa

Florianópolis

2020

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

Ugalde, Fábio Zacouteguy

Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar / Fábio Zacouteguy Ugalde ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa, 2020.
123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Desenvolvimento e validação de método. 3. Composição química de cervejas. 4. Eletroforese Capilar de Zona. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Fábio Zacouteguy Ugalde

Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire
(CCA/UFSC)

Prof., Dr. Juliano De Dea Lindner
(CCA/UFSC)

Prof.(a) Dr.(a) Carmen Maria Oliveira Muller
(CCA/UFSC)

Dr. Heitor Daguer
(MAPA)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências dos alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Dr.(a) Ana Carolina de Oliveira Costa
Orientadora

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo suporte, incentivo e valores que desde cedo ensinaram e fizeram com que eu tivesse a consciência de que só a educação consegue disponibilizar as ferramentas para a transformação do ser humano. Agradeço muito por meus pais, Rogério e Suzane, sempre lembrarem que o estudo é o único caminho para a formação de um cidadão democrático e consciente.

Hoje, tomo consciência que é a educação que luta e se opõe contra uma fatalidade social, onde é capaz de possibilitar com que pessoas ocupem lugares não preestabelecidos, ocupem posições sociais onde consigam auxiliar na transformação de outras pessoas. Fico feliz e agradeço o caminho que estou trilhando, as pessoas que estou conhecendo e as experiências que estou vivendo. Tudo isso graças ao esforço e dedicação em seguir no caminho do eterno aprendizado, na busca pelo discernimento diante do mundo que me cerca.

Atualmente a informação é vasta. É como se estivéssemos em um mar aberto recebendo de modo avassalador dezenas de informações sobre os mais diversos temas. Devemos saber navegar, devemos saber os caminhos para chegar em terra firme e não naufragar nessa trajetória laboriosa e encantadora que é o aprendizado. Com isso, penso que não basta ter o melhor barco, a melhor tecnologia, acredito que nenhum instrumento por mais sofisticado que seja consiga nos ensinar por qual caminho seguir nesse mar agitado, distinguindo o útil do supérfluo, o verdadeiro do falso. Precisamos de uma orientação, precisamos do conhecimento humano e empírico. É por isso que agora venho agradecer à minha orientadora, Ana Carolina, que desde o início me deu liberdade para que eu me expressasse e tomasse algumas rotas alternativas, mas sempre estava de olho, pois sabe que gosto de desbravar mares desconhecidos. Como orientadora, analisou e mostrou-me meus erros e defeitos, induzindo-me a um certo desconforto a primeiro momento, mas no fundo a gente sabe que é para o nosso crescimento. Agradeço muito pela oportunidade de ter trabalhado com ela, vejo como ela se preocupa com os alunos, projetos e o bem-estar laboratorial, as vezes até demais. Vejo que ela também vê os seus próprios erros e trabalha para melhorar. Por isso admiro a professora que me orienta, sabe ser dura, mas sabe ser humana. Admito que sofro um bullying por parte dela de vez em quando, mas nada que atrapalhe. Não tenho muito o que reclamar, creio que o seu pior defeito seja torcer para o Internacional.

Quando cheguei, tive a missão de encarar a Eletroforese Capilar e a validação analítica, entre tapas e beijos fomos nos entendendo. Acredito que a missão de trabalhar com a

Eletroforese Capilar foi realmente um batizado acadêmico, comparo a relação que tive com ela como viver em sociedade: um verdadeiro desafio recheado de beleza e obstáculos no caminho. Doloroso, em certos momentos, porém, essencial para o crescimento. E claro, não conseguiria vencer essa etapa sem a ajuda dos meus colegas de laboratório.

Por isso venho agradecer à professora Roseane e a todas as meninas do Laboratório de Química de Alimentos, que me receberam tão bem, sempre dispostas a ajudar em tudo. Com certeza meu aprendizado nesses dois anos não seria o mesmo se não fosse o grupo forte e unido que temos no LabQA. Agradeço a todas pela amizade e claro, pela paciência comigo. Todas sempre compreensivas para aguentar nossa lamúria acadêmica, que faz parte também.

Um agradecimento especial ao meu amigo Luciano, colega de trabalho, parceiro de análises e conversas sobre a vida. Sempre profissional e disposto a ajudar, atento as características de cada um, valorizando nossas faculdades internas e estimulando nosso aprendizado por completo. Um pouco cético, que nem eu, agradeço por trabalhar junto com ele e espero aprender muito ainda com toda sua paciência e entusiasmo pela química.

Agradeço ao meu amigo Marcello, companheiro de mestrado, conversas e cervejada. Com certeza, nossos encontros até tarde da noite, recheado de conversas sobre sociedade, educação, família e sobre os caminhos a seguir me ajudaram a encarar esse caminho que é estar longe de casa, em outro Estado e conviver com algumas crises existenciais. Claro, tudo isso sempre acompanhado da bebida fermentada que foi objeto de estudo do meu mestrado.

Agradeço à minha amiga e companheira Sthefanie, sempre atenciosa e amorosa. Compartilhando os momentos de alegria e amparando-me nos de dificuldades. Sempre apoiando minhas escolhas e com uma paciência, realmente, divina. Aprendo muito com ela e agradeço por todo carinho e amor recebido.

O término desse trabalho é um momento especial na minha trajetória, do ensino primário ao superior, dezenas de situações favoreceram para que hoje eu concluísse essa dissertação. E não há nada de místico. Mas sim humano, demasiadamente humano. Tenho a certeza de que a construção de todo esse trabalho também foi obtida graças aos inúmeros coadjuvantes, conhecidos ou não, que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação profissional e pessoal. Por isso, agradeço a todos e finalizo com um pensamento do filósofo espanhol Fernando Savater, o qual diz que não podemos aprender a viver com máquinas, apenas com humanos. Estamos condenados a nossos semelhantes, são eles que despertam nossa humanidade. E que isso, fundamentalmente, deve ser o objetivo da educação.

RESUMO

O presente estudo propõe um método rápido para determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos alifáticos por eletroforese capilar. O método foi validado analiticamente de acordo com recomendações da Eurachem e a seguir aplicado em amostras de cervejas comercializadas em Florianópolis, SC. O desenvolvimento do método foi realizado com o auxílio do *software* de simulação em eletroforese capilar *PeakMaster*[®] e planejamento fatorial 2^3 com ponto central. As condições experimentais para a separação simultânea de nove analitos catiônicos (potássio, sódio, cálcio e magnésio) e onze com caráter aniônico (íons cloreto, nitrato, sulfato e fosfato e os ácidos oxálico, pirúvico, cítrico, málico, láctico, succínico e acético) foram: eletrólito de corrida constituído por 45 mmol L⁻¹ de imidazol, 50 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e 5% de metanol, pH 4,62; injeção hidrodinâmica pelas duas extremidades do capilar, de sílica fundida, com pressão de 50 mbar durante 3 s; tensão 15 kV; capilar de 60 cm, sendo o comprimento efetivo de 51,5 cm para os analitos catiônicos e 8,5 cm para analitos aniônicos; modo de detecção indireto em comprimento de onda de 215 nm (referência de 450 nm); o padrão interno foi o ácido 3,5-dinitrobenzóico. O método proposto foi validado quanto aos parâmetros: conformidade do sistema; linearidade e faixa de trabalho; efeito de matriz; seletividade; precisão; exatidão; limites de detecção e quantificação; e robustez, e aplicado em cinco amostras de cervejas *pilsen*. As concentrações variaram de 8,62 a 632,83 mg L⁻¹ para os minerais e de 44,74 a 333,83 mg L⁻¹ para os ácidos orgânicos alifáticos. O ácido oxálico não foi detectado em nenhuma das amostras. O desempenho analítico do método foi considerado satisfatório, demonstrando-se adequado para o acompanhamento de processos cervejeiros, controle da qualidade do produto acabado, e até mesmo em laboratórios de análises de rotina e fiscalização.

Palavras-chave: Análise simultânea. Validação analítica. Método rápido. Cátions. Ânions.

ABSTRACT

The present study proposes a rapid method for simultaneous determination of aliphatic minerals and organic acids by capillary electrophoresis. The method was validated analytically according to Eurachem recommendations and then applied to beer samples sold in Florianópolis, SC. The development of the method was carried out with the aid of the simulation software in capillary electrophoresis PeakMaster® and factorial planning 2^3 with a central point. The experimental conditions for the simultaneous separation of nine cationic analytes (potassium, sodium, calcium, and magnesium) and eleven with anionic character (chloride, nitrate, sulfate and phosphate ions and oxalic, pyruvic, citric, malic, lactic, succinic and acetic acids) were: racing electrolyte consisting of 45 mmol L⁻¹ of imidazole, 50 mmol L⁻¹ of formic acid and 5% methanol, pH 4.62; hydrodynamic injection through the two ends of the capillary, of fused silica, with a pressure of 50 mbar for 3 s; voltage 15 kV; capillary of 60 cm, with an effective length of 51.5 cm for cationic analytes and 8.5 cm for anionic analytes; indirect detection mode at a wavelength of 215 nm (reference 450 nm); the internal standard was 3,5-dinitrobenzoic acid. The proposed method was validated for the parameters: system compliance; linearity and working range; matrix effect; selectivity; precision; accuracy; detection and quantification limits; and robustness - and applied to five samples of lager beers. Concentrations ranged from 8.62 to 632.83 mg L⁻¹ for minerals and from 44.74 to 333.83 mg L⁻¹ for aliphatic organic acids. Oxalic acid was not detected in any of the samples. The analytical performance of the method was considered satisfactory, proving to be suitable for monitoring brewing processes, quality control of the finished product, and even in routine analysis and inspection laboratories.

Keywords: Simultaneous analysis. Analytical validation. Quick method. Minerals. Organic acids. Cations. Anions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Levantamento do número total de cervejarias no Brasil entre os anos de 2002 e 2018.	23
Figura 2 - Representação da estrutura morfológica de um grão de cevada.	25
Figura 3 - Ilustração representativa da estrutura do lúpulo. (a) Cone; (b) Pedúnculo central do cone; (c) Bractéola (folha do cone); (d) Glândula lupulínica.	27
Figura 4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na produção de cervejas.	31
Figura 5 - Representação esquemática do sistema de eletroforese capilar, onde e1 e e2 são os eletrodos.	41
Figura 6 - Representação esquemática da separação por eletroforese capilar de zona, onde em a) ausência de campo elétrico, b) aplicação de campo elétrico e geração do fluxo eletrosmótico e c) migração dos íons conforme a mobilidade eletroforética.	42
Figura 7 - Definição de comprimento total e efetivo do capilar a partir da injeção da amostra até passagem pelo detector.	43
Figura 8 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.	45
Figura 9 - Representação esquemática da separação simultânea de diferentes espécies iônicas por eletroforese capilar de zona.	46
Figura 10 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico, onde A) Fluxo normal; B) Fluxo invertido.	46
Figura 11 - Perfil de velocidade para um fluxo induzido por um campo elétrico (A - fluxo eletrosmótico) e um fluxo induzido por pressão (B - fluxo laminar).	47
Figura 12 - Representação esquemática do modo de detecção indireto.	48
Figura 13 - Representação da interface do <i>software PeakMaster</i> [®] versão 5.4, com simulação da separação de minerais. Sendo (a) parâmetros instrumentais, tempo e mobilidade do fluxo eletrosmótico; (b) Sistema que permite a simulação da amplitude e formato das bandas eletroforéticas; (c) modo de detecção; (d) parâmetros do sistema simulado; (e) constituintes do BGE e analitos selecionados; (f) eletroferograma simulado; (g) configuração do eletroferograma. Onde: 1) Potássio; 2) Cálcio; 3) Sódio; 4) Magnésio.	50
Figura 14 - Fluxograma com as etapas para o desenvolvimento de método em CZE.	51
Figura 15 - Representação esquemática do preparo das amostras para injeção no sistema de eletroforese capilar.	58

Figura 16 - Representação esquemática para verificar qual teste <i>t-Student</i> utilizar a partir da aplicação do teste <i>F</i> , a fim de avaliar o efeito de matriz.	62
Figura 17 - Curva de mobilidade efetiva dos minerais e AOA <i>versus</i> pH para escolha do pH do eletrólito de corrida, onde (A) pH de 1 a 14; (B) pH na região favorável.....	68
Figura 18 - Eletroferogramas da separação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos no <i>software PeakMaster</i> [®] , Condição: 45 mmol L ⁻¹ de ácido fórmico e (A) 20 mmol L ⁻¹ ; (B) 25 mmol L ⁻¹ ; (C) 30 mmol L ⁻¹ ; (D) 35 mmol L ⁻¹ ; (E) 40 mmol L ⁻¹ de imidazol, respectivamente. A tensão foi ajustada para 15 kV. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) láctico, (IS) 3,5 dinitrobenzóico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio.	71
Figura 19 - Eletroferogramas experimental da separação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em solução padrão. Condição: 45 mmol L ⁻¹ de ácido fórmico, 40 mmol L ⁻¹ de imidazol e 5% de MeOH, pH 4,57, 15kV. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) láctico, (IS) 3,5 dinitrobenzóico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio.	73
Figura 20 - Separação dos ânions inorgânicos cloreto e nitrato, Onde: (1) cloreto; (2) nitrato; (3) sulfato. Condição de separação: (A) Relação imidazol/ácido fórmico 40/45 mmol L ⁻¹ e 5% de metanol (pH 4,57); (B) Relação imidazol/ácido fórmico 45/50 mmol L ⁻¹ e 5% de metanol (pH 4,62), ambos com 15 kV. Comprimento até o detector: 8,5 cm.....	74
Figura 21 - Diagrama de Pareto da resposta do planejamento fatorial.....	76
Figura 22 - Eletroferograma do ponto central resultante do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central em triplicata. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) láctico, (IS) 3,5 dinitrobenzóico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio. Condição de separação: 45 mmol L ⁻¹ de imidazol, 50 mmol L ⁻¹ de ácido fórmico e 5% de MeOH. pH 4,62, 15 kV, capilar de 60 cm. Injeção por ambas as extremidades.	78
Figura 23 - Curvas de calibração dos analitos em solução aquosa.....	81
Figura 24 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva aquosa.....	83
Figura 25 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva em matriz.....	89
Figura 26 - Seletividade simulada no software <i>PeakMaster</i> [®] , Legenda: (1) ácido tartárico; (2) ácido ascórbico; (3) ácido sórbico; (4) ácido butírico, Condições de separação simuladas: 45 mmol L ⁻¹ de imidazol e 50 mmol L ⁻¹ de ácido fórmico, pH 4,62, 15 kV, capilar 60 cm. Injeção por ambas as extremidades.	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos contemplando análises de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar.	54
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.	28
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização do eletrólito de corrida.	59
Tabela 3 - Delineamento experimental empregado no teste de <i>Youden</i>	64
Tabela 4 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de <i>Youden</i> , condições nominais e alteradas.	65
Tabela 5 - Dados de pKa e mobilidade dos analitos objeto de estudo.	67
Tabela 6 - Níveis reais e codificados das variáveis e respostas do planejamento fatorial 2^3	75
Tabela 7 - Análise de variância das respostas do planejamento fatorial 2^3	77
Tabela 8 - Resultados da conformidade do sistema para os minerais e ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.	80
Tabela 9 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva aquosa.	85
Tabela 10 - Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva aquosa.	86
Tabela 11 - Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva aquosa.	87
Tabela 12 - Resultados do teste <i>F</i> para avaliação do ajuste ao modelo linear das curvas aquosa.	88
Tabela 13 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva em matriz.	91
Tabela 14 - Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva em matriz.	92
Tabela 15 - Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva em matriz.	93
Tabela 16 - Resultados do teste <i>F</i> para avaliação do ajuste ao modelo linear das curvas em matriz.	94
Tabela 17 - Verificação do efeito de matriz através do teste de <i>t-Student</i>	95
Tabela 18- Resultados de recuperação aparente em amostra de cerveja em diferentes níveis de fortificação.	97
Tabela 19 - Valores recomendados aceitáveis de resultados de recuperação expressos em faixas de concentração.	98
Tabela 20 - Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio expressos em CV%.	99
Tabela 21 - Limites de precisão em função da concentração dos analitos.	101

Tabela 22 - Resultados obtidos para os parâmetros LOD e LOQ.	101
Tabela 23 - Efeito da variação da tensão na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.....	102
Tabela 24 - Efeito da variação do pH na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.....	103
Tabela 25 - Efeito da variação da temperatura na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.....	104
Tabela 26 - Efeito da variação da pressão na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.....	105
Tabela 27 - Efeito da variação do comprimento de onda na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.	106
Tabela 28 - Efeito da variação do tempo de lavagem na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.	107
Tabela 29 - Efeito da variação do tempo de injeção na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.	108
Tabela 30 - Resultados para quantificação de minerais e ácidos orgânicos em cervejas do tipo Pilsen de fabricação nacional.	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOA	Ácido orgânico alifático
BGE	Eletrólito de corrida (do inglês, <i>Background Electrolyte</i>)
CE	Eletroforese capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>)
CV	Coefficiente de variação (%)
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês, <i>Diode-Array Detector</i>)
DOEI	Injeção por ambas as extremidades do capilar (do inglês, <i>Dual opposite-end injection</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>)
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantification</i>)
L_{eff}	Comprimento efetivo (do inglês, <i>Effective Length</i>)
L_{tot}	Comprimento total (do inglês, <i>Total Length</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
UV-Vis	Ultravioleta/Visível (do inglês, <i>Ultraviolet-Visible</i>)
μ_{eff}	Mobilidade efetiva (do inglês, <i>Effective Mobility</i>)
μ_{el}	Mobilidade eletroforética (do inglês, <i>Electrophoretic Mobility</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Objetivos.....	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos específicos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Cerveja.....	22
2.1.1	Produção nacional de cerveja	22
2.2	Principais ingredientes utilizados na produção de cervejas	23
2.2.1	Água.....	24
2.2.2	Malte	25
2.2.3	Lúpulo.....	26
2.2.4	Leveduras.....	29
2.2.5	Adjuntos.....	30
2.3	Produção da cerveja	30
2.4	Tipos de cerveja	32
2.5	Minerais na cerveja	33
2.5.1	Cálcio.....	34
2.5.2	Magnésio.....	34
2.5.3	Sódio	35
2.5.4	Potássio	35
2.5.5	Sulfato.....	35
2.5.6	Fosfato	35
2.5.7	Nitrato	36
2.5.8	Cloreto	36
2.6	Ácidos orgânicos alifáticos na cerveja	36

2.7	Técnicas analíticas aplicadas à determinação de compostos iônicos	37
2.8	Eletofórese capilar	39
2.8.1	Contexto Histórico e Instrumentação	39
2.9	Desenvolvimento de métodos rápidos por CZE.....	49
2.10	Aplicação da eletrofórese capilar em análise de alimentos.....	52
2.10.1	Análise simultânea de minerais e AOA em cerveja por CZE	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	Reagentes	57
3.2	Preparo das soluções.....	57
3.3	Amostras e preparo de amostras.....	58
3.4	Instrumental.....	58
3.5	Planejamento fatorial 2 ³	59
3.6	Análise e tratamento dos resultados	60
3.7	Validação analítica.....	60
3.7.1	Conformidade do sistema	60
3.7.2	Faixa de trabalho e linearidade	61
3.7.3	Efeito de matriz.....	61
3.7.4	Seletividade.....	62
3.7.5	Precisão.....	63
3.7.6	Exatidão	63
3.7.7	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	63
3.7.8	Robustez	64
3.7.9	Determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em amostras de cerveja	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	desenvolvimento do eletrólito de corrida.....	66
4.1.1	Ensaio preliminar ao planejamento fatorial	70

4.1.2	Planejamento fatorial 2^3	74
4.2	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	79
4.2.1	Conformidade do sistema	79
4.2.2	Linearidade	81
4.2.3	Efeito de matriz.....	88
4.2.4	Seletividade.....	95
4.2.5	Exatidão	97
4.2.6	Precisão.....	98
4.2.7	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOD).....	101
4.2.8	Robustez	102
5	APLICAÇÃO DO MÉTODO	110
6	CONCLUSÕES.....	113
7	PERSPECTIVAS.....	114
	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é destaque mundial na produção de cerveja. O país comercializa 14,1 bilhões de litros/ano ocupando o terceiro lugar no ranking mundial da produção da bebida (CERVBRASIL, 2020). O número total de cervejarias legalmente instaladas atingiu a marca de 889 estabelecimentos em 2018, com o total de 15.703 produtos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre cerveja e chope, nos anos de 2017 e 2018, sendo o segmento que apresentou o maior número de registros em 2018 (BRASIL, 2018a).

O setor cervejeiro, um dos mais tradicionais do Brasil, está presente em todo território nacional, possui grande participação no crescimento da economia nacional, movimentando uma extensa cadeia produtiva, que é responsável por 1,6% do produto interno bruto e 14% da indústria de transformação nacional, promovendo 2,7 milhões de empregos. Em 2017, o setor teve um faturamento de 107 bilhões de reais (CERVBRASIL, 2020).

A região sul possui o maior número de cervejarias no país, com 384 estabelecimentos, sendo o Estado de Santa Catarina o quarto colocado no *ranking* nacional, com 105 cervejarias. Em relação à distribuição média de habitantes por cervejarias nos Estados, índice que mede a densidade cervejeira, o Estado é o segundo colocado no *ranking* nacional, com 89.758 habitantes/cervejaria, perdendo apenas para o Rio Grande do Sul, com 79.873 habitantes/cervejaria (BRASIL, 2018).

A cerveja é constituída essencialmente por água, cereais, lúpulo e fermento. A composição de cada ingrediente e as interações ocorridas durante o processo de elaboração representam um grande impacto no produto (PARKER, 2012), refletindo na diversidade de estilos de cervejas disponíveis no mercado.

São inúmeros os fatores que influenciam a qualidade e as características físico-químicas e sensoriais da cerveja, como a composição de carboidratos, proteínas, aminoácidos e vitaminas, que variam de acordo com as matérias-primas utilizadas (ANDERSON et al., 2019), ainda, destacam-se os minerais (disponíveis na cerveja como íons inorgânicos) principalmente devido às funções que desempenham na cerveja, com ênfase na participação em reações enzimáticas, contribuição para o desempenho da fermentação e na construção dos sabores e aromas característicos de cada estilo (MONTANARI et al., 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013). Os cereais e a água são as principais fontes de minerais, sendo os principais íons inorgânicos, os cátions – potássio, sódio, cálcio, magnésio; e ânions – cloreto, sulfato, nitrato,

e fosfato, conseqüentemente, são variadas as concentrações e os minerais encontrados no produto (CORTESE et al., 2019). Além dos minerais, os ácidos orgânicos alifáticos exercem um importante papel no aroma e características sensoriais das cervejas (LI; LIU, 2015), especialmente os ânions provenientes dos ácidos pirúvico, láctico, acético, succínico, cítrico e málico, além de serem considerados indicadores de desempenho da fermentação, demonstrarem influência na acidez e pH, o que contribui para a manutenção da qualidade da cerveja (ANDERSON et al., 2019).

Considerando a contribuição no caráter final das cervejas, se torna relevante conhecer as concentrações desses íons não apenas no produto final, mas também ao longo do processo de fabricação e das matérias primas utilizadas, tornando viável a solução de eventuais dificuldades relacionadas à produção e auxiliar no estabelecimento de padrões relacionados a esses analitos em diferentes estilos de cervejas.

Diversas técnicas analíticas são empregadas na determinação de minerais e ácidos orgânicos em diferentes matrizes, dentre as quais a eletroforese capilar, que dispõe de múltiplas vantagens quando comparada às demais técnicas de separação em meio líquido, uma vez que permite avaliar simultaneamente mais de uma classe de compostos, inclusive de íons com cargas opostas, com destaque para os tempos de análise curtos, mínima geração de resíduos, necessidade de baixos volumes de amostras, baixo custo operacional e ainda a possibilidade de simulação das separações.

Ademais, ainda são escassos os estudos que apresentam as concentrações de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em cervejas, não havendo, até o presente momento, estudos científicos que realizem a determinação simultânea dos minerais catiônicos e aniônicos e ácidos orgânicos alifáticos em cervejas por eletroforese capilar.

Nesse contexto, esse estudo tem como propósito o desenvolvimento e validação de um método rápido de separação para determinar simultaneamente minerais (cátions – potássio, sódio, cálcio, magnésio e ânions – cloreto, sulfato, nitrato, e fosfato) e ácidos orgânicos alifáticos (ácidos oxálico, pirúvico, cítrico, málico, láctico, succínico e acético) em amostras de cerveja utilizando eletroforese capilar de zona.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação simultânea de minerais (catiônicos e aniônicos) e ácidos orgânicos alifáticos por eletroforese capilar de zona, aplicado à amostras de cerveja.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico rápido para separação simultânea de minerais (catiônicos e aniônicos) e ácidos orgânicos alifáticos utilizando ferramentas de simulação em eletroforese capilar;
- Validar o método proposto em relação aos parâmetros de desempenho: faixa de trabalho e linearidade, efeito de matriz, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de detecção e quantificação;
- Aplicar o método desenvolvido e devidamente validado na análise de minerais (cátions – potássio, sódio, cálcio, magnésio e ânions – cloreto, sulfato, nitrato e fosfato) e ácidos orgânicos alifáticos (oxálico, pirúvico, cítrico, málico, láctico, succínico e acético) em amostras de cerveja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

A produção de cerveja é uma das práticas mais antigas da humanidade. Os primeiros registros datam cerca de 9.000 a.C., durante a Revolução Neolítica, no Oriente Próximo (ZARNKOW, 2014) e entre 8.000 e 6.000 a.C., com os sumérios, que viviam na Mesopotâmia (RENNEBERG; BERKLING; LOROCH, 2017).

Historicamente, a cerveja era oferecida às pessoas como uma alternativa mais agradável à água potável, sendo reconhecida por suas propriedades terapêuticas, e tida como uma bebida mais segura em relação à água, uma vez que a fermentação provocava redução no número de patógenos em relação à água (HARRISON, 2009). Com o passar dos anos, a partir da descoberta de que a adição de lúpulo melhorava o sabor da cerveja, outras especiarias passaram a ser empregadas (juntamente com o lúpulo) na produção da cerveja, levando a uma maior estabilidade e diversificação do sabor da bebida (HARRISON, 2009).

No Brasil, o crescimento exponencial do setor promoveu a ampliação do número de estabelecimentos e, conseqüentemente de seus produtos, com o total de 15.703 produtos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre cerveja e chope, nos anos de 2017 e 2018, sendo o segmento que apresentou o maior número de registros em 2018 (BRASIL, 2018a).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019 do MAPA, a cerveja é definida como “a bebida resultante da fermentação, a partir de leveduras cervejeiras, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019).

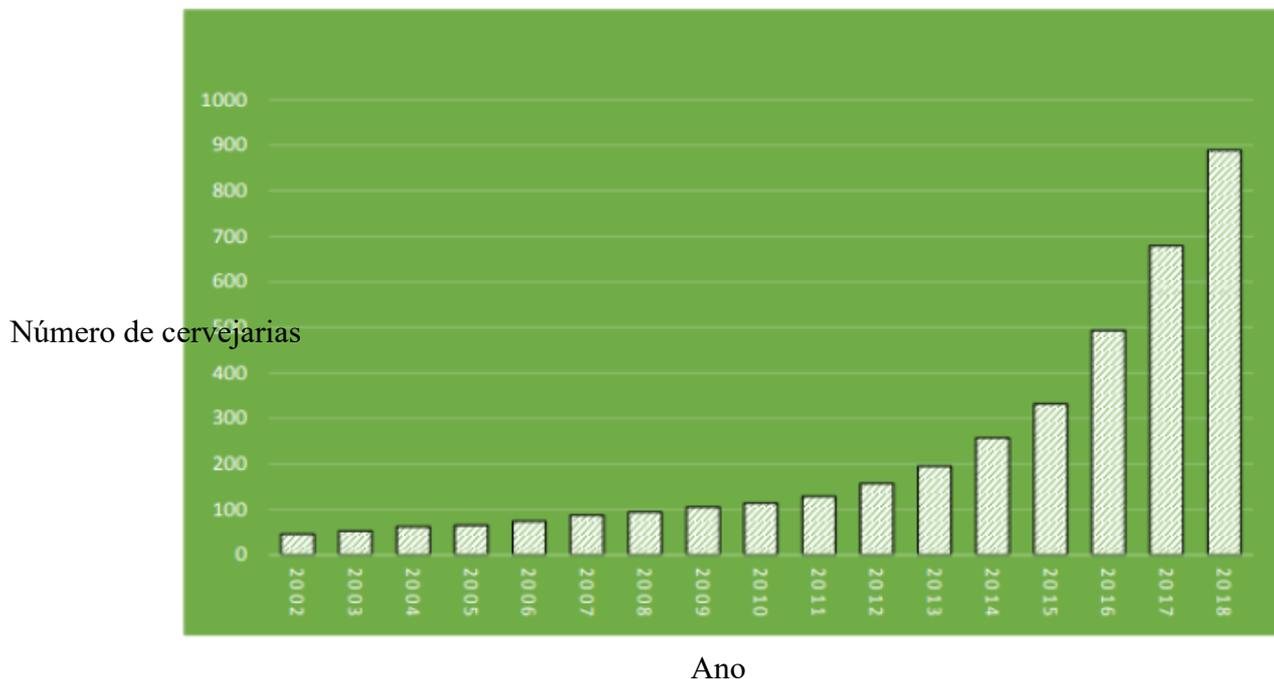
2.1.1 Produção nacional de cerveja

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (Cerv Brasil) o Brasil é destaque mundial na produção de cerveja e comercializa aproximadamente 14,1 bilhões de

litro/ano ocupando o terceiro lugar no *ranking* mundial de produção da bebida o que corresponde a 1,6% do produto interno bruto (CERVBRASIL, 2020).

O número total de cervejarias legalmente instaladas atingiu a marca de 889 estabelecimentos em 2018 (BRASIL, 2018b). O mercado cervejeiro nacional cresceu ao longo dos últimos anos, como demonstrado na Figura 1, com a ampliação do número de estabelecimentos e, conseqüente aumento da oferta de produtos disponíveis no mercado.

Figura 1 – Levantamento do número total de cervejarias no Brasil entre os anos de 2002 e 2018.



Fonte: Brasil (2018b).

A região sul do Brasil possui o maior número de cervejarias no país, com 384 estabelecimentos, sendo o Estado de Santa Catarina o quarto colocado no *ranking* nacional, com 105 cervejarias, alcançando um crescimento de 34,6% em relação ao ano de 2017, ano em que o Estado contava com apenas 78 estabelecimentos (BRASIL, 2018b).

2.2 Principais ingredientes utilizados na produção de cervejas

A cerveja é constituída por centenas de substâncias diferentes, provenientes dos seus ingredientes, podendo algumas permanecer inalteradas durante o processamento, e outras produzidas durante a fermentação e maturação (HORNSEY, 2016). Dentre os principais

ingredientes utilizados na produção de cervejas estão: água, cereais maltados, lúpulo e fermento (LI; WANG; LIU, 2017a), além de adjuntos cervejeiros, frequentemente utilizados no processamento.

A composição das matérias-primas empregadas e a forma como esses ingredientes se combinam durante todo o processo da produção da cerveja têm um grande impacto no caráter físico-químico e sensorial da bebida final (STEWART, 2015), sendo determinantes e responsáveis pela grande diversidade de estilos de cervejas disponíveis atualmente.

A seguir, serão discutidos detalhadamente as principais características relacionadas aos ingredientes comumente empregados na produção de cervejas.

2.2.1 Água

A água é quantitativamente o principal ingrediente da cerveja, representando cerca de 90% ou mais do produto final (STEWART, 2015). A composição da água é de grande importância para a indústria cervejeira e deve atender diversos requisitos legais, tanto físico-químicos quanto microbiológicos (BRASIL, 2011).

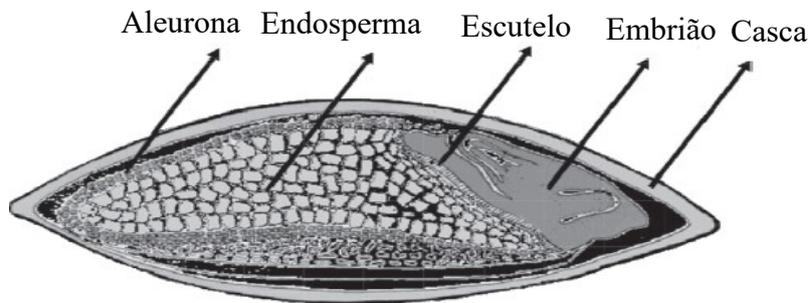
A variedade e a concentração de íons minerais na água possuem um enorme efeito nas propriedades da cerveja, uma vez que a fração de minerais dissolvidos na água ditam a dureza e a alcalinidade da mesma, sendo parâmetros fundamentais para a indústria cervejeira, e que, devem ser conhecidos, visto que influenciam a eficiência da fermentação e a solubilização de outras substâncias procedentes de outras matérias-primas (BUIATTI, 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013). Diversos minerais e outras substâncias originadas de fontes ambientais encontram-se dissolvidas nas águas. Entre os principais íons catiônicos em águas estão Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} ; enquanto HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- e NO_3^- estão entre os principais ânions (THOMAS; ROIG, 2017). Alguns elementos minerais não-metálicos, como N, P e S (exceto o sulfato) podem estar presentes na água, associados na maioria das vezes à poluição ambiental. A concentração e natureza desses elementos são dependentes da origem da poluição (industrial, agrícola, urbana) (THOMAS; ROIG, 2017). Em diversas áreas, a fonte de abastecimento público de água pode sofrer alterações com o passar do tempo, podendo alterar a qualidade da cerveja. As indústrias cervejeiras devem estar sempre atentas aos padrões de identidade e qualidade da água de produção, por meio de relatórios de avaliação desta matéria prima, com

informações atualizadas periodicamente e fornecidos pela empresa de abastecimento (BRASIL, 2011).

2.2.2 Malte

O malte pode ser definido como o produto resultante da germinação controlada de grãos de cereais, como de cevada, milho, trigo, centeio ou aveia, sendo a cevada o cereal mais utilizado para a produção do malte cervejeiro (BRIGGS et al., 2004; STEWART, 2015). A estrutura do grão de cevada pode ser observada a partir da Figura 2.

Figura 2 - Representação da estrutura morfológica de um grão de cevada.



Fonte: Adaptado de Stewart (2015).

Nesse contexto, a malteação consiste em quatro etapas: maceração, germinação, secagem e crivagem.

A maceração tem por finalidade fornecer às sementes o grau de umidade necessário para a germinação, uma vez que na hidratação do grão ocorre o fornecimento de água para a aleurona, permitindo a síntese das enzimas necessárias a fim de disponibilizar as reservas nutritivas do endosperma para o processo de germinação.

O endosperma é a parte do grão da cevada que contém principalmente amido, na forma de grânulos cristalinos, localizados no interior de uma matriz proteica, e localizados dentro de células com paredes celulares finas, que cobrem o próprio endosperma (BETTENHAUSEN et al., 2018; LEWIS; YOUNG, 2001). Durante a germinação, as enzimas amilolíticas, secretadas pela camada do aleuroma originam alterações na camada do endosperma, uma vez que atuam na solubilização e degradação do tecido multicelular do endosperma, por meio da destruição da matriz proteica e dos grânulos de amido, o qual apresenta-se em cadeias menores, o que o torna

menos duro e mais solúvel, e, no interior do grão, formam-se enzimas que são fundamentais para o processo de fabricação de cerveja, além do que as moléculas de açúcares procedentes da quebra do amido tornam-se suscetíveis à fermentação (BETTENHAUSEN et al., 2018; LAŠTOVIČKOVÁ; BOBÁLOVÁ, 2012).

Após a etapa de germinação, quando a produção de enzimas e as modificações no endosperma atingem as características desejáveis para o processo de fabricação da cerveja, a atividade biológica deve ser interrompida por meio da secagem, ou seja, o malte deve ser seco de modo a preservar sua atividade enzimática. A secagem se dá em temperaturas que variam de acordo com a coloração final desejada para o malte (claro ou escuro) (PARKER, 2012; STEWART, 2015).

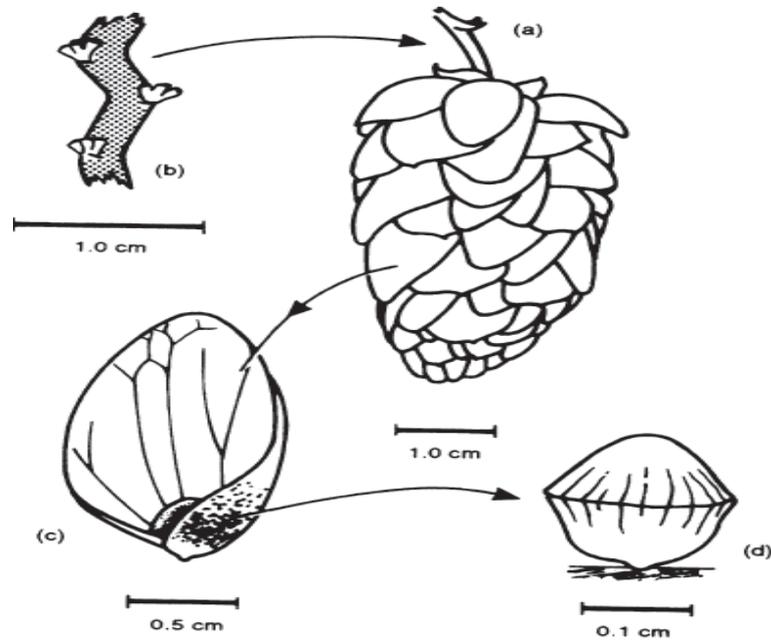
Após a secagem, o malte é separado da radícula e do caulículo por uma operação denominada crivagem, sendo que esses subprodutos são destinados a fábricas de ração.

O malte é considerado a principal fonte de proteínas, lipídeos e carboidratos encontrados na cerveja, sendo responsável por aproximadamente 75% da concentração total dos minerais encontrados em cervejas. A composição mineral do malte está associada à variedade; local e método de cultivo; condições climáticas; sistemas de colheita; armazenamento; e processo de maltagem empregado (SHALA et al., 2013).

2.2.3 Lúpulo

Lúpulo são as flores fêmeas ou "cones" da planta *Humulus lupulus*. As glândulas de lupulina, presentes no cone contêm importantes substâncias que estão entre as principais responsáveis por conferir aroma, amargor e sabor às cervejas (STEWART, 2015). A planta do lúpulo é uma trepadeira perene, com plantas masculinas e femininas separadas, sendo que os cones da planta feminina utilizados na produção de cervejas. Até o século XV, antes da introdução do lúpulo no processo de fabricação, as cervejas eram aromatizadas com especiarias e ervas (PARKER, 2012). O gênero *Humulus* é pertencente à família *Cannabinaceae*, que inclui *Cannabis* (cânhamo e maconha) e *Celtis* ("hackberry"), sendo que alguns membros desta família são conhecidos pela presença de resinas farmacologicamente ativas, no entanto, os constituintes resinosos do lúpulo não possuem tais propriedades. O lúpulo é uma planta perene e nativa da Europa, Ásia e América do Norte (STEWART, 2015). A estrutura da planta do lúpulo pode ser observada a partir da ilustração da Figura 3.

Figura 3 - Ilustração representativa da estrutura do lúpulo. (a) Cone; (b) Pedúnculo central do cone; (c) Bractéola (folha do cone); (d) Glândula lupulínica.



Fonte: Briggs et al. (2004).

O cone de lúpulo compreende um galho central que transporta vários nós. Cada nó tem duas brácteas semelhantes a folhas, e quatro bractéolas semelhantes a folhas menores. O valor sensorial do lúpulo é encontrado nas resinas e óleos, contidos nas glândulas de lupulinas, encontradas mais extensivamente na base de cada bractéola (Tabela 1) (LI; WANG; LIU, 2017a).

Tabela 1 - Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.

Constituinte	Quantidade % (m/m)
Celulose e Lignina	43,0
Resinas totais	15-30
Óleos Essenciais	0,5-3
Água	10,0
Cinzas	8,0
Taninos	4,0
Ceras e esteroides	Traços-25
Pectina	2,0
Açúcares Simples	2,0
Proteína	15,0
Aminoácidos	0,1

Fonte: Durello; Silva; Bogusz (2019).

Além de contribuir para o sabor e amargor da cerveja, o lúpulo pode auxiliar na formação e estabilidade da espuma. Ademais, possui propriedades antimicrobianas e fornece proteção contra a deterioração da cerveja. O lúpulo contém uma grande variedade de espécies químicas, entretanto, somente dois constituintes são fundamentais para a produção de cervejas: as resinas, responsáveis pelo amargor; e os óleos essenciais, que conferem os diferentes aromas às cerveja (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

As resinas podem ser classificadas em resinas macias (solúveis em hexano) e resinas duras (não solúveis em hexano). As resinas duras compreendem principalmente formas oxidadas e polimerizadas das substâncias presentes em resinas macias, enquanto a fração de resina macia contém duas classes de compostos, conhecidas como humulones (α -ácidos) e lupulones (β -ácidos), solubilizados e extraídos durante a fervura do mosto, quando são isomerizados oxidativamente a iso- α -ácidos (iso-humulones), que são os compostos amargos mais importantes da cerveja. A extensão dessa isomerização é a responsável pelo amargor da cerveja, sendo o grau de amargor classificado de acordo com a Unidade Internacional de Amargor (IBU, do inglês *International Bitterness Units*), que tem uma escala definida e semelhante à concentração expressa por mg/L (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

O lúpulo contém entre 0,5 % e 3,0 % de óleos essenciais e, os sabores característicos da cerveja são em grande parte provenientes das substâncias aromáticas provenientes dele. Os óleos essenciais do lúpulo são uma mistura complexa de várias centenas de componentes e compreendem duas frações principais: as primeiras pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos, sendo que 70% são constituídos pelos terpenóides e os 30% restantes são compostos contendo oxigênio (fração oxigenada que geralmente é mais aromática e menos volátil), tais como aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos e álcoois (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019; HARRISON; ALBANESE, 2017).

2.2.4 Leveduras

As leveduras são micro-organismos eucarióticos, predominantemente unicelulares e pertencentes ao Reino Fungi e possuem a habilidade de metabolizar os constituintes do mosto, caldo resultante da mistura de malte e água após a fervura, rico em açúcares fermentáveis. A composição do mosto e a cepa da levedura utilizada desempenham um papel importante no caráter final da cerveja (HARRISON; ALBANESE, 2017; STEWART, 2015).

Embora o etanol seja o principal produto do metabolismo produzido pela levedura durante a fermentação do mosto, esse álcool primário pouco contribui para o sabor da cerveja, sendo o tipo e a concentração de outros produtos de excreção os principais responsáveis por tal característica, estando diretamente relacionados ao processo metabólico de cultivo, temperatura, pH da fermentação, o tipo e a proporção de adjunto, o modelo de fermentador, a concentração do mosto, e finalmente a linhagem da levedura (TOKPOHOZIN; FISCHER; BECKER, 2019). O gênero *Saccharomyces* apresenta várias linhagens consideradas seguras e capazes de produzir dois metabolitos primários importantes, etanol e dióxido de carbono. A indústria cervejeira, entretanto, classifica a levedura em duas classes: *Ale*-leveduras (*S. cerevisiae*) e *Lager*-leveduras (*S. pastorianus*). A distinção é mantida para separar leveduras usadas para a produção de cervejas *Ale*, que são fermentadas em temperaturas mais elevadas (entre 16 e 22 °C), e cervejas do tipo *Lager*, as quais caracterizam-se pela fermentação em temperaturas mais baixas (entre 6 e 16 °C) (LIVENS, 2015; TOKPOHOZIN; FISCHER; BECKER, 2019). No entanto, algumas cervejas são produzidas a partir de uma única cepa, sendo que outras são fermentadas com o emprego de cepas mistas. Além do álcool e dióxido de carbono, a levedura produzirá outros compostos importantes, tais como álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas, compostos de enxofre, os quais desempenham um

papel fundamental no perfil sensorial e físico-químico do produto (LI; WANG; LIU, 2017b; LIVENS, 2015).

2.2.5 Adjuntos

Segundo a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, que estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria, adjuntos cervejeiros são as matérias-primas que substituam, em até 45% em peso em relação ao extrato primitivo, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro (BRASIL, 2019).

Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira não malteada e os demais cereais malteados ou não-malteados aptos para o consumo humano como alimento. Adicionalmente são considerados adjuntos cervejeiros o mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, aptos para o consumo humano como alimento (BRASIL, 2019).

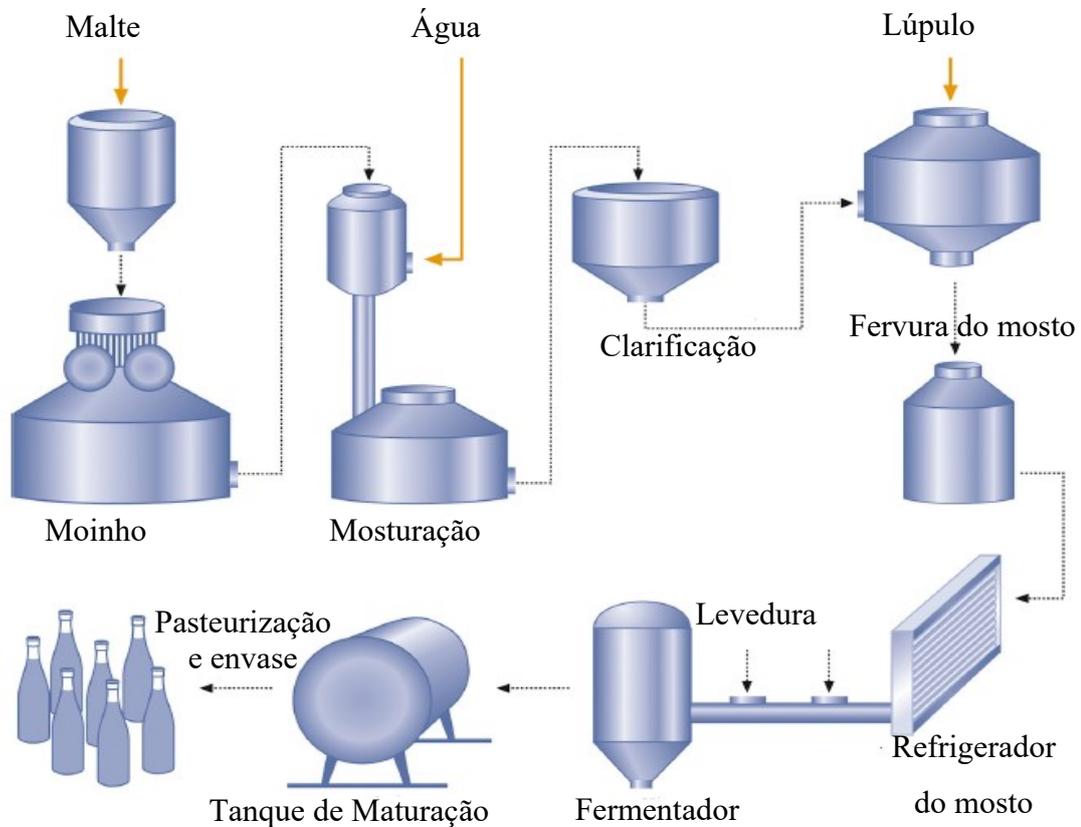
Alguns cereais como cevada, trigo, arroz, milho, sorgo açúcar e xarope podem ser usados como adjuntos em substituição de parte do malte. A adição destes cereais ocorre na etapa de produção do mosto, gerando material fermentável adicional para a levedura cervejeira, além promover a redução dos custos e diminuir o teor de nitrogênio no extrato, uma vez que os compostos proteicos apresentam baixa solubilidade.

O uso de adjuntos tende a dissolver os sabores e a cor característicos do malte, com isso, as cervejas com adição de adjuntos tendem a ter um sabor mais leve, com coloração mais clara, em comparação com as cervejas puro malte (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017).

2.3 Produção da cerveja

A produção da cerveja, de maneira geral, é dividida nas seguintes etapas: maltagem, moagem do malte, mosturação, fervura do mosto, fermentação, maturação, filtração (clarificação), pasteurização e envase (HARRISON; ALBANESE, 2017), conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na produção de cervejas.



Fonte: Adaptado de Renneberg, Berkling e Loroeh (2017).

O processo de maltagem, como apresentado anteriormente, tem como objetivo principal fornecer um amplo suprimento de enzimas para hidrólise do amido, proteínas e outros componentes do grão (HARRISON; ALBANESE, 2017). O malte é moído e a etapa seguinte é de mosturação.

A mosturação envolve a hidrólise do amido, proteínas e outros compostos provenientes na cevada malteada, dos cereais não maltados (adjuntos) presentes em solução. Esta etapa se dá a partir da contribuição de inúmeras enzimas, com a produção de um extrato fermentável e solúvel em água (STEWART, 2015). A partir daí, o mosto é levado a altas temperaturas em tanque de aquecimento e é nessa etapa que é adicionado o lúpulo ao mosto.

A fervura do mosto é conduzida com diversos objetivos (STEWART, 2015), entre os quais:

- Inibir a ação de micro-organismos remanescentes;
- Inativar as enzimas residuais após a mosturação;
- Ampliar a extração de óleos essenciais e resinas do lúpulo;
- Precipitar substâncias responsáveis pela turbidez;
- Auxiliar no desenvolvimento da cor;
- Remover substâncias voláteis indesejadas;
- Concentrar o mosto.

A seguir o mosto é resfriado e então inoculado com a levedura para que ocorra o processo de fermentação. Durante essa etapa, a levedura produzirá álcool, dióxido de carbono e alguns compostos aromáticos adicionais. A cepa de levedura empregada dependerá do tipo de cerveja desejado (LIVENS, 2015).

Após esse processo, a cerveja é mantida em temperaturas mais baixas por um período de tempo determinado, na etapa de maturação, o que depende do tipo de cerveja a ser produzida. Essa etapa é muito importante para o desenvolvimento das características sensoriais da cerveja, e conseqüentemente, da identidade do produto. A maturação tem duração de semanas e pode chegar até meses, dependendo do estilo, e é nesse período que ocorrem as mudanças no aroma e sabor da cerveja (HARRISON; ALBANESE, 2017). Em seguida à maturação, é realizada a clarificação da cerveja por meio de filtração ou centrifugação, a fim de remover compostos sólidos que precipitam, tornando a cerveja com coloração e sabor mais suaves. Por fim, a cerveja é pasteurizada, ou não caso o objetivo seja a produção de chope, a seguir envasada e comercializada (HARRISON; ALBANESE, 2017; LI; WANG; LIU, 2017a).

2.4 Tipos de cerveja

Atualmente existem inúmeros estilos de cerveja disponíveis no mercado. Estas podem distinguir-se pelas matérias-primas empregadas na preparação, formato de produção e fermentação, a partir dos diversos tempos e maneiras de maturação e clarificação, e também de como a cerveja será acondicionada (BRIGGS et al., 2004). A cerveja é comumente classificada em *Lagers* e *Ales*, e segundo sua origem geográfica e história distribuem-se em diversos estilos, entre os quais destacam-se: *Pilsner*, *Bock*, *Porter*, *Stout*, *India Pale Ale*, *Lambic*, além de muitos outros existentes atualmente (BAMFORTH, 2020).

2.5 Minerais na cerveja

Dentre os critérios considerados pelos fabricantes de cerveja destacam-se os minerais e respectivas concentrações presentes no produto, principalmente devido às funções que exercem no produto, como participação em reações enzimáticas, contribuição para o desempenho da fermentação e na construção dos sabores e aromas característicos de cada estilo. Entre os principais minerais presentes estão os cátions – cálcio, magnésio, sódio e potássio, e os ânions – sulfato, nitrato, fosfato e cloreto (CORTESE et al., 2019). A composição mineral da água é particularmente importante para a qualidade e o sabor do produto final. Na cerveja, a maior porcentagem dos minerais é proveniente do malte, enquanto o restante é proveniente da água e do lúpulo (BETTENHAUSEN et al., 2018; LI; WANG; LIU, 2017a).

Apesar do malte ter a maior contribuição de minerais na cerveja, a concentração mineral da água cervejeira possui significativo efeito nas propriedades do produto acabado, tendo grande reflexo no sabor do produto (PALMER; KAMINSKI, 2013). Contudo, é importante o conhecimento da composição de cada matéria-prima, a fim de verificar a contribuição dos ingredientes empregados na produção da cerveja, sendo necessário o acompanhamento dessas substâncias nos tanto nos ingredientes como também no produto final.

Um ponto de grande interesse na indústria cervejeira, com relação à concentração de minerais, está relacionado com a dureza da água, sendo esta classificada em água “mole ou dura”. A água mole apresenta baixa quantidade de sais dissolvidos, em especial sais de cálcio e magnésio, enquanto que a água dura apresenta elevadas concentrações desses sais, principalmente bicarbonato e sulfatos de cálcio (BRIGGS et al., 2004; PALMER; KAMINSKI, 2013). Esses íons afetam diretamente o desempenho da mosturação e fermentação da cerveja (PALMER; KAMINSKI, 2013). A água dura ainda pode ser dividida em dureza temporária ou permanente. A dureza temporária é causada principalmente pelo bicarbonato de cálcio, que durante a fervura da água, é convertido em carbonato de cálcio, precipitando-se e podendo ser removido da água. Por outro lado a dureza permanente é causada principalmente pelo sulfato de cálcio, o qual não é removido com a fervura da água (PALMER; KAMINSKI, 2013).

Tradicionalmente, as cervejarias eram localizadas em locais com bom suprimento de água, e esta, por sua vez, influenciava nas características da cerveja produzida (PALMER; KAMINSKI, 2013; PARKER, 2012) conforme a concentração dos minerais dissolvidos na água. A seguir, serão discutidas detalhadamente as contribuições dos principais íons inorgânicos durante o processo de produção da cerveja.

2.5.1 Cálcio

Na produção de cerveja, o íon cálcio desempenha diversas funções, contribuindo para muitas reações que envolvem leveduras, enzimas e proteínas. O cálcio é o principal íon que determina a dureza da água potável (PALMER; KAMINSKI, 2013). Esse cátion reage com o fosfato do malte no mosto, precipitando os fosfatos de cálcio e liberando os íons de hidrogênio, que por sua vez reduzem o pH. A redução do pH é essencial, pois fornece um ambiente ideal para a α e β -amilase e enzimas proteolíticas (BUIATTI, 2009). O cálcio promove clarificação, sabor e estabilidade ao produto final, uma vez que promove a coagulação de proteínas e a floculação de leveduras (PALMER; KAMINSKI, 2013).

Em águas com pouca concentração de cálcio, é necessária sua adição, a fim de assegurar a atividade enzimática ideal durante a produção da cerveja. Entretanto, elevados teores no mosto (ex: $>250 \text{ mg kg}^{-1}$) podem inibir a absorção de magnésio pela levedura e afetar o desempenho da fermentação (LEWIS; YOUNG, 2001; PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.5.2 Magnésio

Na produção de cerveja, o íon magnésio está diretamente relacionado com aumento do metabolismo da levedura, sendo essencial durante a fermentação, pois as células da levedura necessitam de uma alta demanda de magnésio, que não pode ser suprida por meio de outros íons metálicos (PALMER; KAMINSKI, 2013). Íons de magnésio são importantes para a levedura, pois atuam como co-fatores enzimáticos, contribuindo para o processo de fermentação (BRIGGS et al., 2004).

Assim como o cálcio, os íons de magnésio também podem reagir com o fosfato do malte, porém o fosfato formado é mais solúvel que os formados pelo cálcio, liberando menos íons de hidrogênio no mosto e como consequência um menor aumento na acidez é observado. Elevadas concentrações de íons magnésio pode contribuir para o desenvolvimento de um sabor azedo ou uma adstringência na cerveja (BUIATTI, 2009; LEWIS; YOUNG, 2001; PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.5.3 Sódio

Íons sódio em pequenas concentrações (75 a 150 mg kg⁻¹) estão associados à doçura e uma maciez acentuada na cerveja, e, quando associados a íons cloreto possuem sabor mais agradáveis, quando comparados à associação aos íons sulfato, que produzem um sabor levemente amargo no produto final (BUIATTI, 2009; MONTANARI et al., 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.5.4 Potássio

O íon potássio tem grande contribuição no metabolismo da levedura durante a fabricação da cerveja, e juntamente com o magnésio, atua como um cofator para as leveduras, sendo necessário em pequenas concentrações para uma fermentação satisfatória (MONTANARI et al., 2009). Íons potássio também podem ter efeito negativo sensorialmente, quando presente em elevadas concentrações, resultando em um sabor salgado ao produto final (MONTANARI et al., 2009; POHL, 2009) e, produzindo uma cerveja com características laxativas (BUIATTI, 2009).

2.5.5 Sulfato

O íon sulfato tem um efeito positivo na degradação do amido e da proteína, favorecendo a filtração do mosto. Também auxilia na percepção do lúpulo, acentuando o amargor característico deste, entretanto, em concentrações elevadas o amargor pode se tornar adstringente e desagradável (MONTANARI et al., 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.5.6 Fosfato

A presença de íons fosfato é importante para o processo de fermentação. O fósforo é essencial para a produção de ATP, formação da dupla membrana fosfolipídica ao redor da célula de levedura e tamponamento do meio. A carência de fosfato causa e redução no crescimento celular e complicações na fermentação (MONTANARI et al., 2009). O fosfato não faz parte dos critérios estabelecidos no padrão de identidade e qualidade da água de origem, entretanto, podem ser tanto um contaminante, quanto um aditivo comum no tratamento de água.

A contaminação normalmente vem de escoamento agrícola e resíduos industriais (PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.5.7 Nitrato

Na produção de cerveja, o íon nitrato não possui efeito sobre as características sensoriais do produto final, entretanto, esse íon pode ser convertido a nitrito, este por sua vez, pode afetar a multiplicação da levedura empregada, prejudicando o processo de fermentação (BUIATTI, 2009; MONTANARI et al., 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013). Além disso, uma preocupação no consumo de alimentos com altos níveis de nitrato, é que esse íon, no organismo humano, pode ser convertido a nitrito e este pode reagir com aminas secundárias, formando *N*-nitrosaminas, compostos que podem ser carcinogênicos e teratogênicos (WARD; BRENDER, 2011).

2.5.8 Cloreto

Na produção de cerveja, o íon cloreto, em sua forma livre, fornece doçura, corpo e suavidade à cerveja. O cloreto auxilia na clarificação e estabilidade coloidal do produto final, entretanto, em altas concentrações pode limitar a floculação da levedura e prejudicar o sabor final da cerveja, levando a um sabor mineral ou salgado quando combinado com sulfato ou sódio (BRIGGS et al., 2004; BUIATTI, 2009; MONTANARI et al., 2009; PALMER; KAMINSKI, 2013).

2.6 Ácidos orgânicos alifáticos na cerveja

Vários estudos indicam a presença de diversos ácidos orgânicos alifáticos (AOA) em cervejas, com destaque para os ácidos acético, málico, cítrico, lático, succínico e pirúvico (DAS et al., 2014; KOZAKI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2010; SOGA; ROSS, 1997).

Os AOA são uma classe de compostos orgânicos importantes na cerveja, pois contribuem de forma significativa em características sensoriais do produto, além de possuírem forte relação com o pH da cerveja, uma vez que a presença dos AOA auxilia na acidificação do mosto cervejeiro durante a fermentação, contribuindo para a manutenção da qualidade da

cerveja. Adicionalmente, a presença de alguns AOA em determinadas concentrações podem introduzir um sabor amargo, podendo ser intencional, quando o objetivo é produzir cervejas ácidas, ou não intencional, devido à contaminação com ácido acético por exemplo (ANDERSON et al., 2019; BRIGGS et al., 2004; LI; LIU, 2015). A concentração dos AOA é dependente das matérias-primas empregadas, do processo de fabricação da da cerveja, das leveduras utilizadas e das condições de fermentação (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005).

Os AOA são formados principalmente durante o processo de fermentação, sendo que as reações bioquímicas que ocorrem durante esta etapa causam efeitos cumulativos a partir do crescimento da levedura no mosto. O consumo de nutrientes e a formação de etanol, dióxido de carbono e outros metabólitos, que em conjunto contribuem para a cerveja, são considerados subprodutos do crescimento de leveduras (LIVENS, 2015). Consequentemente, os ácidos orgânicos formados são constituintes importantes da cerveja, pois contribuem para as características sensoriais, como sabor; na determinação do prazo de validade do produto, auxiliando na inibição do crescimento de algumas bactérias deteriorantes, como a *Salmonella*; também atuam como um indicador de fermentação; e na distinção entre os diferentes tipos de cervejas, permitindo o reconhecimento das matérias primas utilizadas e variações nas técnicas de fabricação de cerveja e processo fermentativo (ANDERSON et al., 2019; DAS et al., 2014).

Todos esses fatores demonstram a relevância no estudo desses compostos, não só para o produto resultante ao final do processo, mas durante as etapas de produção, permitindo com isso estabelecer um controle mais completo da qualidade de cervejas. Ainda, a determinação dessas substâncias permite monitorar e corrigir ou até mesmo evitar eventuais dificuldades relacionadas ao processo produtivo ou das próprias matérias primas empregadas.

2.7 Técnicas analíticas aplicadas à determinação de compostos iônicos

A determinação de compostos iônicos em alimentos e bebidas pode ser realizada a partir de diferentes técnicas analíticas modernas com destaque para espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*) (MEYER et al., 2018), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) (MARQUES; NÓBREGA, 2017), espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES, do inglês *inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*) (MOUNTENEY et al., 2018), espectrofotometria de absorção atômica

sem chama (FAAS, do inglês *flameless atomic absorption spectrophotometry*) (DAŞBAŞI et al., 2016), espectroscopia de absorção atômica (AAS, do inglês *atomic absorption spectroscopy*) (EL-ZOMRAWY, 2018), espectrometria atômica fluorescente (AFS, do inglês *atomic fluorescent spectrometry*) (WANG et al., 2017) cromatografia iônica com espectrometria de massas (IC/MS, do inglês *ion chromatography mass spectrometry*) cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (SOO LIM et al., 2018) e recentemente cromatografia de fluido supercrítico (SFC, do inglês *supercritical fluid chromatography*) (FOULON; DI GIULIO; LECOEUR, 2017).

Embora essas técnicas recebam destaque na química analítica e demonstrem em sua grande maioria sensibilidade elevada, por outro lado também apresentam em alguns casos características indesejáveis, tais como a necessidade do uso de solventes orgânicos, abertura da amostra com reagentes que apresentam toxicidade, longos tempos de análise, necessidade de elevado volume de amostra, elevada geração de resíduos, além de algumas possuírem um alto custo operacional.

Nesse contexto, em contraponto às características citadas, a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary eletrophoresis*) demonstra diversas vantagens, quando comparada às demais técnicas analíticas, uma vez que apresenta relativa simplicidade instrumental, separações com alta eficiência, baixo custo operacional e simplicidade instrumental, injeção de reduzidos volumes de amostras (na ordem de nanolitros), baixo consumo de reagentes, e utilização de água como principal solvente, com a mínima geração de resíduos e toxicidade, além da possibilidade de determinar simultaneamente cátions e ânions em uma mesma coluna capilar, e conseqüentemente proporcionar um aumento da frequência analítica com a redução nos tempos de análise, atendendo às atuais demandas de laboratórios de análises de alimentos e bebidas – tanto fiscais, de rotina, de pesquisa ou de prestação de serviços – por métodos rápidos e que atendam aos princípios da química verde. (JONES; BREADMORE, 2018; TAVARES, 1995).

2.8 Eletroforese capilar

2.8.1 Contexto Histórico e Instrumentação

A técnica de separação foi descrita pela primeira vez pelo bioquímico Arne Tiselius, na década de 30, quando, após posicionar uma mistura de proteínas entre soluções tampão em um tubo e aplicar um campo elétrico, percebeu a migração das moléculas presentes na amostra (soro humano) em uma única direção, e de acordo com as cargas e mobilidades dos analitos (TAVARES, 1995; HARRIS, 2012). No entanto, a eficiência de separação em solução livre (ou eletroforese de fronteira móvel, como denominada primeiramente) foi limitada por fenômenos de difusão e convecção térmicas, resultantes do campo elétrico aplicado. As pesquisas foram avançando como tentativa de minimizar as limitações encontradas pela nova técnica, quando em 1967, Hjertén, publicou um estudo que iria contribuir de forma definitiva para a inserção da eletroforese entre as técnicas de separações. Sua descoberta descreveu a aplicação em eletroforese em tubos estreitos e abertos, de dimensões capilares e com alguns milímetros de diâmetro interno, como alternativa ao formato de placa, uma vez que estes tubos demonstram baixa condutância, pouco aquecimento, e, a princípio são anticonvectivos. Essas características permitiram a aplicação da eletroforese em solução livre ou capilar, o que não era possível em eletroforese em placa, e também a aplicação de campos elétricos maiores que os aplicados em eletroforese em placa. Foi então que a partir de 1981 a técnica passou a ser reconhecida, após o estudo publicado por Jorgenson e Lukacs, que demonstrada a eficiência da separação com o uso de capilares de sílica fundida, com diâmetros internos (d.i.) reduzidos (75 μm), combinado à aplicação de voltagens elevadas. O desenvolvimento destes capilares foi um marco importante na história da eletroforese capilar (CE). Além disso, Jorgenson também elucidou a teoria com maiores detalhes, descrevendo as relações entre os parâmetros operacionais e a qualidade das separações, demonstrando o potencial da CE como uma técnica analítica com grande potencial de aplicação (LAUER; ROZING, 2009).

Com o passar dos anos, o crescente interesse na técnica estimulou o desenvolvimento de instrumentos comerciais providos de sistemas sofisticados de injeção de amostra, detecção em linha e aquisição de dados, fazendo com que a técnica se tornasse atraente para análises de rotina (JAGER; TAVARES, 2001).

Uma das grandes vantagens da CE é a sua vasta possibilidade de aplicações. Primeiramente utilizada para separação de macromoléculas biológicas, logo a CE passou a ser

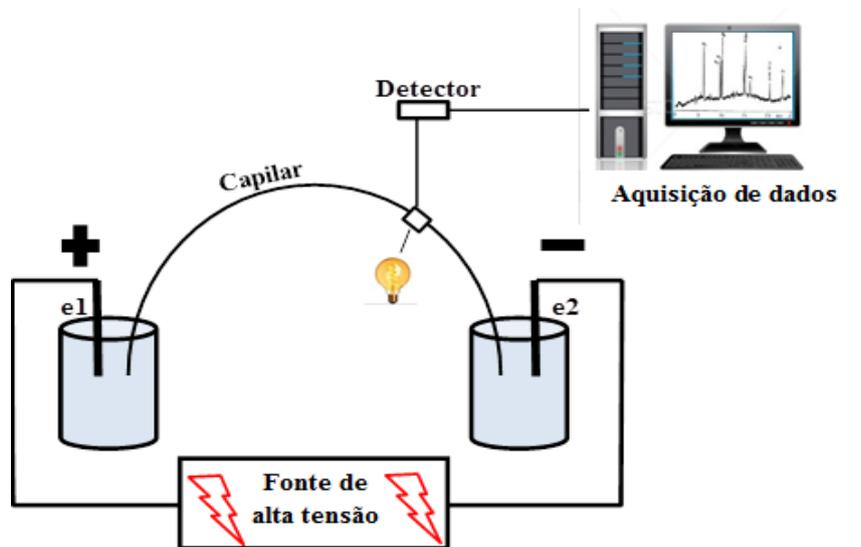
útil na quantificação de aminoácidos (LUO et al., 2017), ácidos graxos (BARRA et al., 2014), ácidos orgânicos (AZEVEDO et al., 2014), compostos fenólicos (TALLINI et al., 2015), carboidratos (RIZELIO et al., 2012a), vitaminas (WANG et al., 2018) minerais (RIZELIO et al., 2012b), dentre outros.

A versatilidade da CE se dá pelo grande número de separações eletrodirigidas a partir de diferentes mecanismos de separação e aplicação em amostras de diversas espécies (DA SILVA et al., 2007). Esta técnica também é conhecida por eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*) ou em solução livre (FSCE, *free solution capillary electrophoresis*), e está baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos), em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, os quais podem conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas. Outras técnicas de eletromigração em capilares podem ser consideradas, sendo amparadas por diferentes princípios de separação que, em alguns casos, podem possuir semelhança. Estas incluem as técnicas eletroforéticas capilares e as técnicas cromatográficas capilares, as quais utilizam campo elétrico para bombeamento dos fluidos, com destaque para: eletroforese capilar de zona; eletroforese capilar de afinidade; eletroforese capilar de peneiramento; eletroforese capilar em gel; focalização isoelétrica capilar; isotacoforese capilar; cromatografia eletrocínética; cromatografia eletrocínética micelar; cromatografia eletrocínética em microemulsão; eletrocromatografia capilar.

Neste estudo a CZE será abordada de forma breve, uma vez que foi empregada na separação dos analitos de interesse em cervejas. Em separações envolvendo CZE a amostra é inserida em uma das extremidades da coluna capilar, previamente preenchida com eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*), e na presença de um campo elétrico, os analitos migram no interior da coluna capilar com direção e velocidade determinadas pela razão massa/carga (BOSSERHOFF; HELLERBRAND, 2009; TAVARES, 1997), sendo a mais empregada na análise de cátions e ânions em diversas matrizes.

Uma característica fundamental da CE é a simplicidade da instrumentação necessária para promover a separação dos solutos. O sistema consiste basicamente por uma fonte alta tensão, capilar, eletrodos de platina, reservatórios de solução, detector e um sistema para coleta e tratamento dos dados (BOSSERHOFF; HELLERBRAND, 2009; TAVARES, 1995). Os componentes podem ser observados na ilustração da Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática do sistema de eletroforese capilar, onde e1 e e2 são os eletrodos.



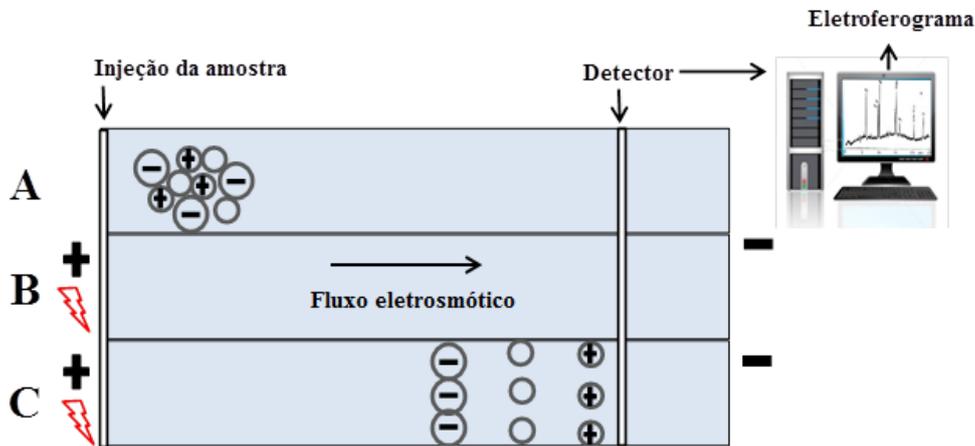
Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A fonte de alta tensão normalmente pode ser operada à voltagem e/ou corrente constante, com tensão podendo variar de -30 à $+30$ kV e corrente de $0 - 200$ μA (TAVARES, 1996). Os capilares utilizados em CE são essencialmente constituídos por sílica fundida com diâmetro interno variando de 20 à 100 μm , comprimento de 20 à 100 cm e tratados externamente com poliimida. Os reservatórios de entrada e/ou saída do capilar podem conter o eletrólito de corrida, a amostra a ser injetada ou até mesmo outras soluções pertinentes ao método de separação proposto. O sistema de detecção mais simples amplamente empregado em CE é o de absorção na região do UV-VIS, devido à facilidade de adaptação deste tipo de dispositivo no capilar e também pela sua aplicabilidade. O computador tem a função de permitir a operação do equipamento e conseqüentemente os parâmetros do sistema, além da aquisição e tratamento de dados da análise por meio de um *software* específico. Outra parte importante é o sistema de controle da temperatura do capilar que tem por finalidade minimizar efeitos do aquecimento Joule. A termostatização pode ser realizada pela circulação de um líquido refrigerante ou por ar forçado, por meio de um suporte de fixação do capilar (TAVARES, 1996).

Para promover a separação eletroforética o capilar deve ser preenchido com a solução do eletrólito de corrida apropriado e a amostra introduzida em uma das extremidades do mesmo. Em seguida ambas as extremidades do capilar e os eletrodos da fonte de alta tensão

são inseridos nos reservatórios contendo eletrólito e é aplicada uma diferença de voltagem ao sistema. Durante a aplicação da tensão as espécies iônicas presentes na amostra injetada migram com mobilidade eletroforética a uma dada velocidade e direção determinadas pela sua massa e carga, e, eventualmente passam pelo detector, e a partir daí as informações são coletadas e armazenadas por um sistema de aquisição/análise de dados, de acordo com a ilustração da Figura 6 (HEIGER, 2000; JAGER; TAVARES, 2001; WESTON; BROWN, 1997).

Figura 6 - Representação esquemática da separação por eletroforese capilar de zona, onde em a) ausência de campo elétrico, b) aplicação de campo elétrico e geração do fluxo eletrosmótico e c) migração dos íons conforme a mobilidade eletroforética.

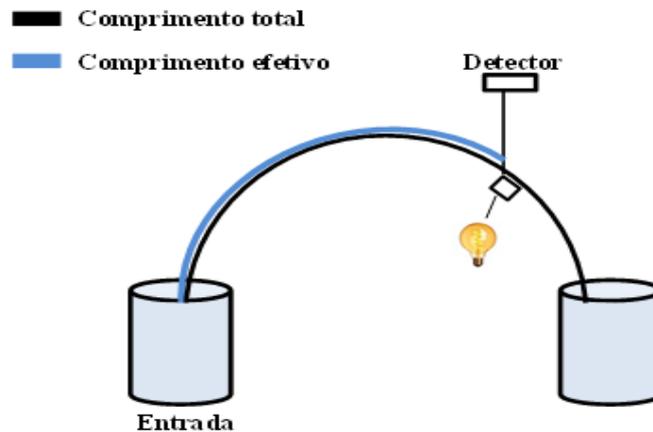


Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A direção e velocidade de migração são dependentes do tamanho dos íons e suas cargas. As espécies positivamente carregadas irão migrar em direção ao eletrodo de carga negativa, o cátodo, as espécies negativamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo de carga positiva, o ânodo, e as espécies neutras migrarão na mesma velocidade do fluxo eletrosmótico (discutido posteriormente). Assim, cátions migram mais rápido que o fluxo eletrosmótico, neutros na mesma velocidade, e os ânions migram mais lentamente, sendo a ordem de migração cátions, neutros e ânions (TAVARES, 1995).

O comprimento total de um capilar é determinado pela distância entre as suas extremidades, e o comprimento efetivo é definido como a distância entre a extremidade de injeção e o local de detecção (Figura 7).

Figura 7 - Definição de comprimento total e efetivo do capilar a partir da injeção da amostra até passagem pelo detector.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Os capilares da CE apresentam diâmetros estreitos (15 a 100 μm) e geralmente são compostos por sílica fundida, material que proporciona baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica e química e alta transmitância óptica, em um intervalo considerável de comprimento de onda (190 a 900 nm) (TAVARES, 1996).

Há duas maneiras de *injeção da amostra* no capilar, e a maneira pela qual a amostra é introduzida tem relação direta com a análise quantitativa (TAVARES, 1995). Em CE, as amostras podem ser introduzidas por injeção eletrocinética ou hidrodinâmica. Na *injeção eletrocinética* os reservatórios contendo BGE e amostra são posicionados nas extremidades do capilar e é aplicada uma diferença de potencial por um tempo determinado. Os analitos iônicos são introduzidos como resultado da combinação entre as velocidades eletroforéticas e eletrosmótica, enquanto os analitos neutros são injetados somente devido à mobilidade do fluxo eletrosmótico.

Uma dificuldade inerente à injeção eletrocinética é que, a quantidade de cada analito transportado depende da mobilidade eletroforética dos solutos individuais. Esse tipo de injeção é menos utilizado, quando comparado à injeção hidrodinâmica, uma vez que pode resultar em uma amostragem discriminativa e não representativa dos analitos da amostra, visto que a injeção de íons com maior mobilidade será mais elevada em comparação com íons de menor mobilidade (FISCHER; JANDERA, 2006; HEIGER, 2000; TAVARES, 1995).

No modo de *injeção hidrodinâmica*, amplamente utilizado, é aplicada uma diferença de pressão entre as extremidades de entrada e saída do capilar. A pressão pode ser empregada por diferentes métodos, entre eles: pressurização, vácuo ou sifonagem (FISCHER; JANDERA, 2006; HEIGER, 2000; TAVARES, 1997).

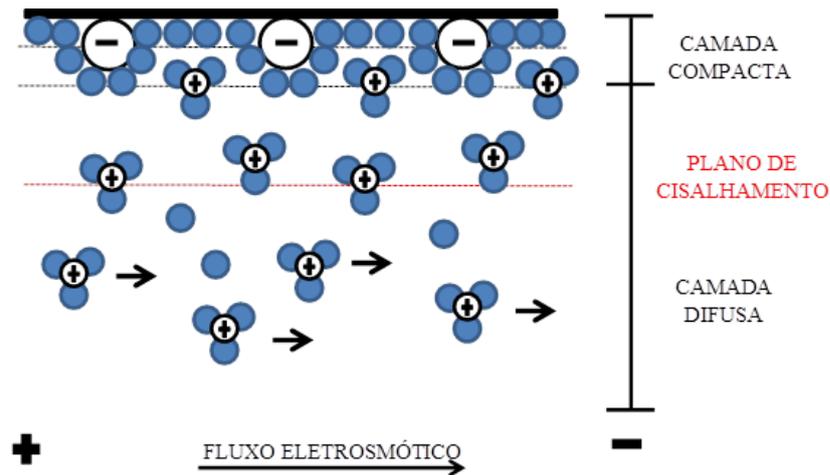
Algumas estratégias durante a etapa de injeção da amostra podem ser empregadas a fim de reduzir os tempos de análise, e quando aplicadas podem proporcionar desde o aumento da frequência analítica do método, quanto permitir a determinação simultânea de analitos aniônicos e catiônicos. Sendo assim, além da injeção convencional, em que a amostra é introduzida no capilar pela extremidade mais afastada do detector, destacam-se: (i) injeção pela extremidade do capilar mais próxima do detector (SEI, do inglês *short end injection*) e (ii) injeção por ambas as extremidades do capilar (DOEI, do inglês *dual opposite-end injection*).

Nesse contexto, a análise simultânea de espécies aniônicas e catiônicas pode ser alcançada a partir da injeção DOEI. A amostra é introduzida nas duas extremidades do capilar, a introdução dos cátions se dá pela extremidade anódica. A migração dos cátions acontece a partir da extremidade anódica em direção a catódica e vice versa para as espécies aniônicas. Quando o campo elétrico é aplicado, os analitos migram em direções opostas, mas ambas são detectadas pelo sistema de detecção do método. A fim de minimizar possíveis co-migrações o fluxo eletrosmótico deve ser minimizado ou suprimido (JAGER; TAVARES, 2001; SÁIZ et al., 2014).

Em CE existe um fenômeno que está presente em todas as separações, em maior ou menor magnitude, o qual contribui para o aumento/diminuição da mobilidade dos íons, e esse fenômeno é conhecido como *fluxo eletrosmótico* (EOF, do inglês *electroosmotic flow*). Esse fenômeno se dá em decorrência da presença de grupos silanóis ionizados no interior do capilar de sílica, os quais conferem a este material um caráter ácido fraco ($pka \sim 4-6$). Quando esses grupos são colocados em contato com o meio aquoso ocorre a desprotonação de alguns desses, gerando uma superfície interna ao capilar carregada negativamente. A magnitude do EOF é dependente do pH do meio, pois haverá uma menor ou maior quantidade de carga na superfície interna do capilar. Esse fenômeno também está relacionado com o potencial eletrocinético ou potencial zeta. A concentração de contra íons na superfície do capilar é elevada, e decresce à medida que se afasta da superfície. Essa região de gradiente de concentração de contra-íons, denominada camada difusa da dupla camada elétrica, onde existe uma fração de contra íons que em função da distância da superfície não sofre atração das cargas negativas, denominada plano

de cisalhamento. A partir desse plano para o centro da solução, as espécies iônicas hidratadas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta devido à atuação das forças elétricas sobre os íons. Esse movimento dos íons conduz a solução no interior do capilar como um todo caracterizando o EOF, como mostra a Figura 8 (TAVARES, 1995).

Figura 8 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.

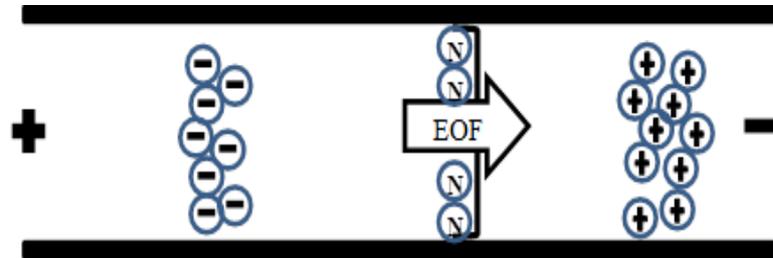


Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A magnitude do EOF varia com o pH, quando mais elevados, situação em que os grupos silanóis estão predominantemente desprotonados, a densidade de cargas na parede é maior, com isso o EOF é significativamente maior quando comparado a pH baixos, onde os silanóis estão protonados. Portanto, o EOF é uma função das propriedades físico-químicas da superfície do capilar e do pH da solução (LAUER; ROZING, 2009).

O EOF é um fenômeno que está presente em todas as separações por CE, com maior ou menor intensidade, e quando não for um valor negligenciável, pode contribuir positiva ou negativamente para a mobilidade das espécies iônicas que estão sendo separadas. Em condições normais, ou seja, superfície do capilar negativamente carregada, o fluxo é proveniente do ânodo (eletrodo positivo) para o cátodo (eletrodo negativo). Dessa forma, cátions, ânions e espécies neutras podem ser separados em uma única corrida, conforme ilustrado na Figura 9. Os cátions migram mais rápido, pois a atração eletroforética em direção ao cátodo e o EOF estão na mesma direção, as espécies neutras são transportadas com a mesma velocidade do EOF, mas não são separados um do outro, e os ânions migram mais lentamente, pois são atraídos para o ânodo, mas ainda são transportados pelo EOF em direção ao cátodo, sendo este definido como modo EOF normal.

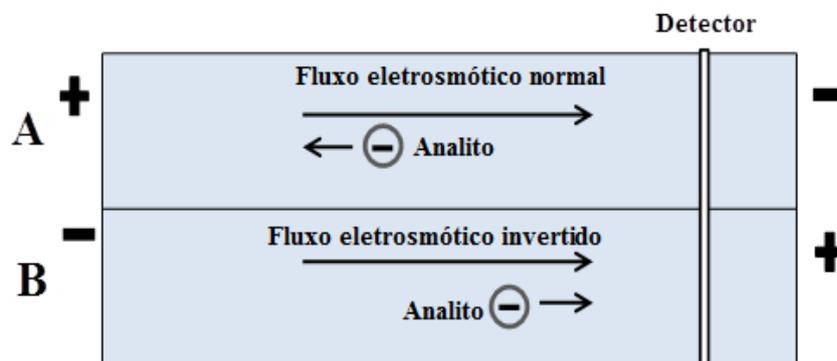
Figura 9 - Representação esquemática da separação simultânea de diferentes espécies iônicas por eletroforese capilar de zona.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Em condições normais, o EOF migra em direção ao cátodo, porém, o mesmo pode ser invertido ou até mesmo suprimido. Tenssoativos catiônicos (por exemplo, CTAB, do inglês *cetyl trimethylammonium bromide*) podem ser adicionados ao BGE com a função de inverter o fluxo, enquanto os catiônicos revestem a superfície interna do capilar (negativamente carregada) formando uma bicamada fortemente aderida à parede do capilar, invertendo efetivamente a carga da parede e tornando-a negativamente carregada. Assim, quando o campo elétrico é aplicado, os ânions do BGE criam um EOF do cátodo para o ânodo (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997), como pode ser observado a partir da Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico, onde A) Fluxo normal; B) Fluxo invertido.

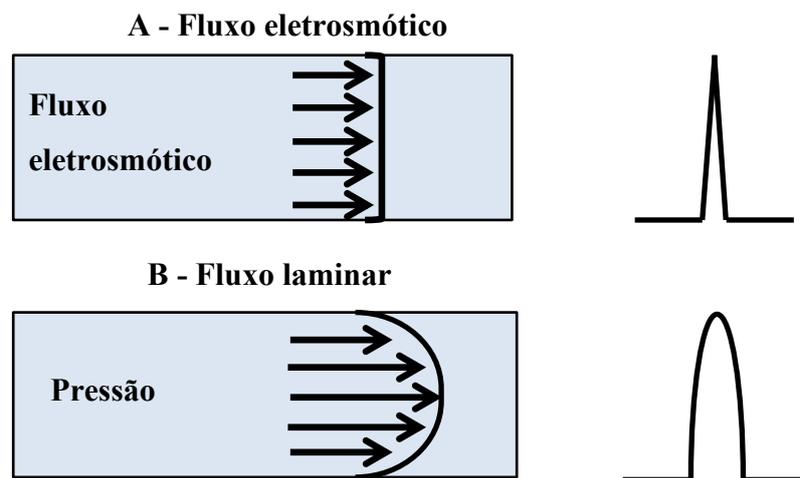


Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

O EOF possui um perfil radial constante de velocidade eletrosmótica, que conduz a solução capilar, o qual difere da cromatografia de alta eficiência, em que se observa um perfil

de velocidade parabólico, característico de fluxo induzido por pressão, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Perfil de velocidade para um fluxo induzido por um campo elétrico (A - fluxo eletrosmótico) e um fluxo induzido por pressão (B - fluxo laminar).



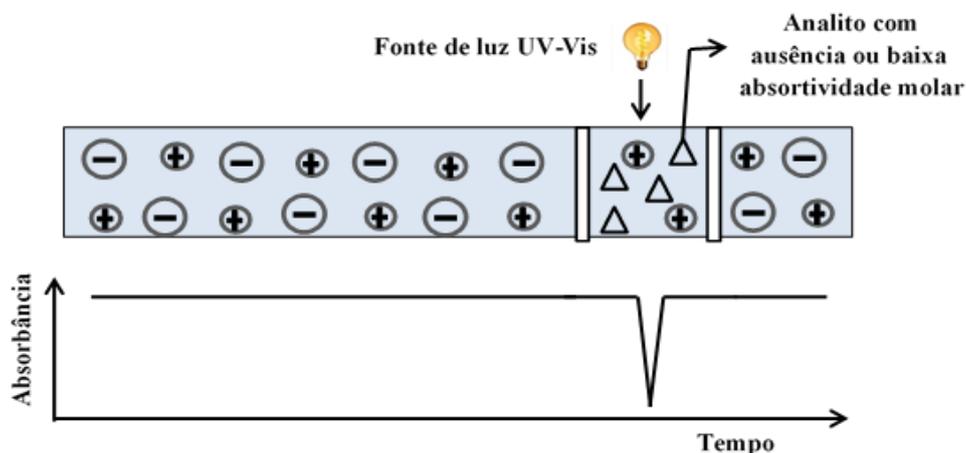
Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Essa particularidade possibilita separações com maiores eficiências, minimizando o alargamento das bandas eletroforéticas (TAVARES, 1997).

A escolha do sistema de detecção para uma análise em particular por eletroforese capilar deve levar em consideração alguns critérios importantes, tais como sensibilidade, seletividade, faixa linear de concentração e ruído. Os detectores comumente empregados em eletroforese capilar podem ser classificados como universais e específicos, sendo que os universais determinam a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução, portanto o sinal não depende das propriedades do soluto, mas da diferença entre as propriedades do soluto e da solução. São dispositivos que empregam métodos indiretos de detecção, e nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e de condutividade. Por outro lado, os detectores específicos, medem uma propriedade específica do soluto, sendo limitados aos solutos que apresentem aquela propriedade. Nessa categoria estão incluídos os fotodetectores (baseados na região do UV-VIS, fluorescência, espalhamento Raman), os detectores amperométricos, radiométricos e espectrômetros de massas. Detectores específicos demonstram diversas vantagens em relação aos universais, contemplando maior sensibilidade; maior intervalo linear de resposta; e melhor relação sinal/ruído. Além disso, são os mais

empregados em eletroforese capilar quando comparados aos universais (TAVARES, 1996), sendo os fotodetectores na região do UV-VIS os mais utilizados. Dentre as vantagens destacam-se o baixo custo de aquisição e manutenção, além de uma ampla variedade de moléculas que podem ser detectadas facilmente. Na detecção no modo direto, a molécula do soluto deve apresentar em sua estrutura um grupo cromóforo, isto é, que absorva radiação UV/VIS em algum comprimento de onda da faixa emitida pelo detector, um sinal será gerado e este é proporcional à concentração do soluto na solução analisada. É importante destacar que nesse modo de detecção os componentes do BGE não devem absorver radiação. Ainda, uma característica marcante da CE em relação a outras técnicas, consiste na possibilidade de detecção de analitos que não possuem grupos cromóforos, ou que apresentem baixa absorvidade molar. Isso se dá por meio da detecção no modo indireto, onde um agente cromóforo é adicionado ao BGE, e tanto aquelas espécies que absorvem na região UV/VIS quanto as que não possuem absorção podem ser detectadas. Seu princípio se baseia na capacidade de absorção de luz pelo agente cromóforo adicionado ao BGE, no comprimento de onda selecionado. O cromóforo adicionado ao BGE transmite um sinal de fundo contínuo no sistema e, quando um analito que não apresenta absorvidade molar (ou que apresenta baixa absorvidade molar) passar pelo detector, ocasionará uma mudança na concentração de íons do BGE e a detecção do analito será realizada indiretamente, pelo deslocamento do sinal a partir da diminuição da absorbância do agente cromóforo do BGE (JAGER; TAVARES, 2001), como ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Representação esquemática do modo de detecção indireto.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

2.9 Desenvolvimento de métodos rápidos por CZE

Uma importante ferramenta no desenvolvimento de métodos por CZE é o *software PeakMaster*[®]. O *software* foi desenvolvido por Gaš e colaboradores (GAŠ et al., 2005) e é disponibilizado gratuitamente na internet (<https://web.natur.cuni.cz/gas/>), sendo possível prever o comportamento do eletrólito de corrida e dos solutos em CZE. O *software* conta com um banco de dados com mais de 300 compostos, e ainda há a possibilidade de adicionar outros os quais se conheçam as constantes de dissociação e mobilidade eletroforéticas. Dentre as informações fornecidas pelo sistema destacam-se: parâmetros relevantes do eletrólito de corrida, tais como pH, força iônica e capacidade tamponante; características importantes do soluto, incluindo o sinal de resposta para detecção por UV (modo direto ou indireto), ou detecção por condutividade, tendência de deformação do pico (EMD, do inglês *electromigration dispersion*); previsão de eventuais picos de sistema. O uso do *Peakmaster*[®] traz diversas vantagens, mas considera-se como principal a possibilidade de desenvolver um método por CZE sem qualquer necessidade de consumo de reagentes. Além disso, este é um *software* didático, com tutoriais explicativos, facilitando sua utilização e que reproduz – na maioria das vezes – com grande similaridade os resultados obtidos experimentalmente. A Figura 13 representa um exemplo de simulação da separação de ânions utilizando o *software PeakMaster*[®] versão 5,4.

interface do software *PeakMaster*[®] versão 5.0, tempo e mobilidade do fluxo eletrosmo, e mobilidades eletroforéticas; (c) modo de detecção selecionados; (f) eletroferograma simulado para (a) Magnésio.

Run parameters

Total capillary length (cm)	48.5
Capillary length to detector (cm)	40
Polarity (at injection site)	Positive
Driving voltage (V)	30000
EOF	Mobility
EOF mobility (1e-9 m ² /Vs)	4

Run settings

Ionic strength correction

Amplitudes and Shapes

Signal

Direct

System parameters

pH	4.052
Ionic strength (mM)	35.081
Conductivity (S/m)	0.327
Resistivity (Ωmm)	3.056
Buffer capacity (mM)	24.393
EOF marker time (min)	26.944
EOF mobility (1e-9 m ² /Vs)	4.000
1. system eigenmobility	3.325
2. system eigenmobility	0.000

BGE constituents

Name	c (mM)	u_eff	μ(1)(mM)	μ(0)(mM)	μ(1)(mM)	μ(0)(mM)
FORMIC ACID	50.000	-35.168	35.081	14.919		
IMIDAZOLE	35.000	45.655		2.37e-02	34.976	

Analytes

Name	Amount	u_eff	L_max	EMD	Cond. signal	UV[FO...]	UV[IM...]
SODIUM	M	45.591	2.173	1.31e-02	-1.31e-02	-1.00e-03	-1.001
CALCIUM	M	45.762	2.125	-0.446	0.448	2.33e-02	-1.975
MAGNESIUM	M	41.105	2.382	1.975	-1.975	-0.113	-2.121
POTASSIUM	M	68.463	1.495	-3.633	3.633	0.170	-0.621

Electropherogram

Chart scale

Signal best fit

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

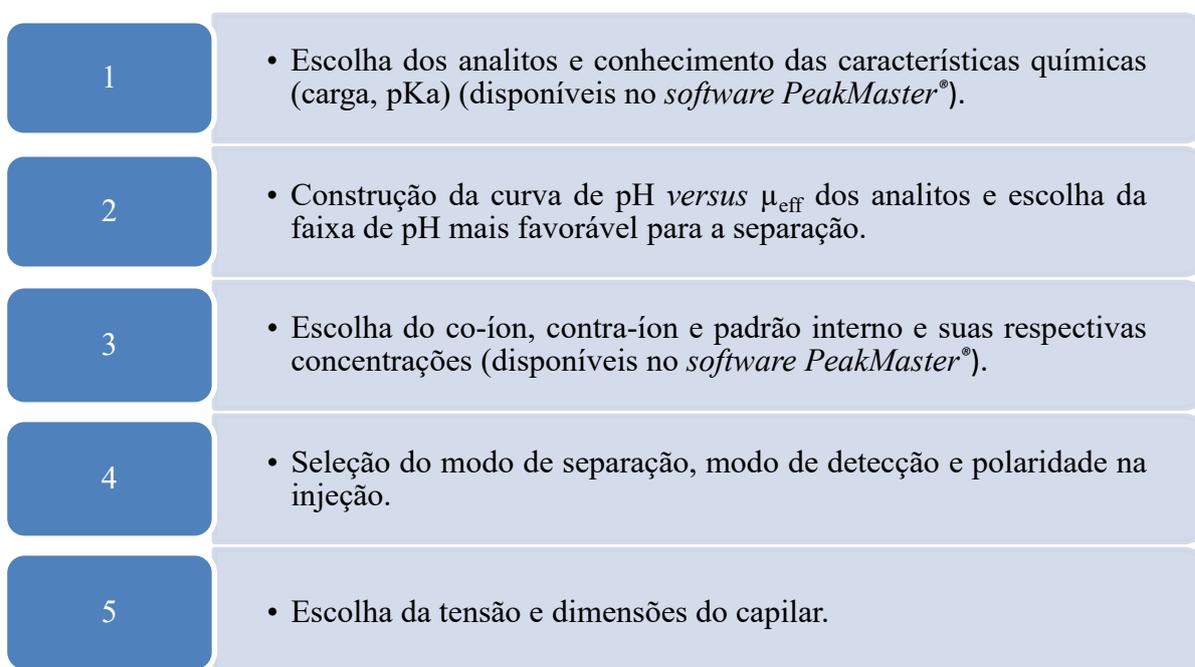
(f)

(g)

O uso dessa ferramenta é bem estabelecida no desenvolvimento de métodos por CE. Estudos como o de Azevedo et al., (2014), Dolzan et al., (2013) e Rizelio et al., (2012b) demonstram a vantagem na utilização desse *software* que, além de permitir o desenvolvimento de separações, fornece resultados preliminares, elimina a necessidade de consumos de reagentes e como consequência a geração de resíduos químicos, o que reafirma as características intrínsecas da técnica, os quais atendem à química verde.

Para o desenvolvimento de métodos em CZE não há um protocolo a ser seguido, porém, de maneira racionalizada algumas etapas podem ser seguidas, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma com as etapas para o desenvolvimento de método em CZE.



Fonte: Adaptado de Della Betta (2016).

De acordo com o fluxograma, a primeira etapa para o desenvolvimento do método em CZE consiste na escolha dos analitos de interesse e o conhecimento de suas características química, como estrutura química, carga e constante de dissociação ácida (pKa). As informações relacionadas aos analitos podem ser obtidas em bancos de dados de *softwares* de simulação, literatura científica ou ainda pode ser determinada experimentalmente. Após a seleção dos analitos de interesse, é realizada a construção da curva de pH *versus* mobilidade, sendo que as informações relacionadas à mobilidade dos analitos pode ser conhecida pelo *software*

PeakMaster[®]. A partir da curva de mobilidade *versus* pH obtida, é possível observar o intervalo em que a diferença entre as mobilidades dos analitos é maior, e assim determinar a região ideal do pH de separação, a fim de alcançar a separação com resolução adequada.

Após escolhido o intervalo do pH de separação, é imperativo escolher os componentes do BGE, sendo que, o co-íon escolhido deve ser compatível com o modo de detecção empregado e apresentar mobilidade efetiva (μ_{eff}) similar ao analito de interesse, ou, quando se tratar de mais de um analito, esse (co-íon) deve ser similar à média das mobilidades dos mesmos. A escolha do co-íon adequado reduz os efeitos de dispersão por eletromigração (EMD, do inglês, *electromigration dispersion*), resultando em bandas eletroforéticas simétricas e eficientes. Por outro lado, o contra-íon do BGE deve apresentar o pKa próximo ao pH de separação escolhido, a fim de garantir uma boa capacidade tamponante (é recomendado acima de 10 mmol L⁻¹) (DELLA BETTA, 2016).

Cabe destacar que a utilização de um padrão interno (I.S., do inglês, *internal standard*) em métodos de CZE é altamente recomendável a fim de corrigir possíveis erros de injeção associados aos pequenos volumes introduzidos no capilar. O IS deve estar completamente ionizado no pH escolhido, apresentar mobilidade efetiva similar à do co-íon e dos analitos, e não estar presente nas amostras estudadas em concentrações detectáveis.

Além disso, outros aditivos comumente utilizados em eletroforese capilar são os solventes orgânicos, como metanol ou acetonitrila, com o objetivo de melhorar a solubilidade do analito, controlar o fluxo eletrosmótico e proporcionar melhora na seletividade. O uso de solventes orgânicos promove a modificação da solvatação e da interação iônica, resultando em mudanças de mobilidade, podendo favorecer nas separações eletroforéticas (JOUYBAN; KENNDLER, 2014). Contudo, os testes com solventes orgânicos devem ser realizados experimentalmente.

2.10 Aplicação da eletroforese capilar em análise de alimentos

Nos últimos anos, a CE encontrou claramente um lugar na análise de alimentos em virtude de sua alta capacidade de resolução, mínimo emprego de reagentes e amostras, facilidade de automação e tempos de análises relativamente curtos (KARLINSEY, 2012).

A determinação de minerais em méis (RIZELIO et al., 2012b), nitrito e nitrato em produtos cárneos (DELLA BETTA et al., 2016), ácidos orgânicos alifáticos em águas residuais

de fécula de mandioca (DE SENA AQUINO et al., 2014), determinação de ácidos orgânicos e íons inorgânicos em vinhos (LELOVA et al., 2018), determinação de fraudes (HELLER et al., 2011), histamina em atum (VITALI et al., 2013), entre tantos outros, são exemplos de estudos científicos publicados com foco em aplicações da técnica na análise de alimentos e bebidas, contemplando temas como qualidade, composição, segurança e autenticidade.

A cerveja apresenta em sua composição uma variedade de compostos de diversas classes, e, por ser uma técnica analítica altamente versátil, a CE apresenta importante relevância na determinação do perfil de substâncias com potencial em fornecer resultados que auxiliem no acompanhamento do processo e do controle da qualidade desta bebida popular tão apreciada.

Diferentes estudos, incluindo a determinação de aminas biogênicas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas (HE et al., 2017), aminoácidos (LUO et al., 2017), purinas e pirimidinas (KLAMPFL et al., 2002), carboidratos (SZILÁGYI et al., 2018) e vitaminas (MAZINA; GORBATSOVA, 2010) demonstram a grande versatilidade da CE voltada para análise de cervejas.

2.10.1 Análise simultânea de minerais e AOA em cerveja por CZE

Embora não seja recente o interesse na determinação de compostos iônicos em cerveja por eletroforese capilar, ainda são poucos os estudos encontrados na literatura científica que abordam o tema. O Quadro 1 apresenta uma compilação dos estudos encontrados na literatura, no que diz respeito à determinação de minerais e ácidos orgânicos em cervejas, com destaque para analitos de interesse, modo de detecção e o tempo de análise.

Quadro 1 – Estudos contemplando análises de minerais e ácidos orgânicos em cervejas por eletroforese capilar.

Analitos/Deteção	Tempo de análise	Referência
Cloreto, sulfato, oxalato, formiato, malato, succinato, citrato, piruvato, acetato, lactato, fosfato e piroglutamato Deteção: UV-indireto	6,5 min	(SOGA; ROSS, 1997)
Cloreto, sulfato, oxalato, formiato, malato, succinato, citrato, piruvato, acetato, lactato, fosfato e piroglutamato Deteção: UV-indireto e condutividade	7 min UV-indireto 8,5 min condutividade	(KLAMPFL; KATZMAYR, 1998)
Potássio, sódio, cálcio, magnésio, zinco, bário, cloreto, sulfato, piruvato, acetato e lactato Deteção: Condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D) Para cada classe um capilar foi utilizado (análise com 3 capilares simultaneamente)	Cátions 6 min Ânions inorgânicos 5,6 min Ânions orgânicos 9,1 min	(MAI et al., 2016)
Cloreto, nitrato, sulfato, potássio, cálcio, magnésio, sódio, zinco, lítio, cobre, 10 amins biogênicas e 16 aminoácidos Deteção: (C ⁴ D)	22 min	(GUO; GUO; CHEN, 2019)

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: C⁴D, do inglês, *capacitively coupled contactless conductivity detector*.

No estudo realizado por Soga e Ross (1997), os autores quantificaram ânions orgânicos e inorgânicos (sendo 3 minerais e 9 ácidos orgânicos). O BGE utilizado foi composto por 5

mmol L⁻¹ M PDC (do inglês, *2,6-pyridinedicarboxylic acid*) e 0,5 mmol L⁻¹ CTAB (do inglês, *Cetyl trimethylammonium bromide*) para inversão do fluxo eletrosmótico, pH 5.6. O capilar era de sílica fundida com 80,5 cm (72 cm de comprimento efetivo). A voltagem aplicada foi de -25 kV para redução do tempo de análise. O método foi aplicado em cervejas (estilo não identificado) com um tempo de análise de 6,5 minutos. Apesar do método ter obtido bom desempenho em um tempo rápido de análise, apenas analitos aniônicos foram determinados no estudo, sendo somente 3 minerais.

Klampfl e Katzmayer (1998) determinaram os mesmos analitos do estudo anterior, apenas ânions orgânicos e inorgânicos (3 minerais e 9 ácidos orgânicos). O BGE foi composto por 7,5 mmol L⁻¹ de ácido aminobenzóico e 0,12 mmol L⁻¹ TTAB (do inglês, *tetradecyltrimethylammonium bromide*) para inversão do fluxo eletrosmótico, pH 5,75 ajustado com Histidina. Foi realizado a detecção por UV-indireto e por condutividade. O capilar era de sílica fundida com comprimento efetivo de 48 cm para a detecção com UV-indireto e 60 cm para detecção por condutividade. A voltagem aplicada foi de -30 kV para redução do tempo de análises. O método por aplicado em vários estilos de cervejas (*pilsen*, *stout*, cerveja de trigo, de milho, e sem álcool) com um tempo de análise de 7 minutos para detecção por UV-indireto e de 8,5 min para detecção por condutividade. Da mesma maneira que o estudo anterior, o método foi eficiente na quantificação de 12 analitos com um tempo rápido de análise, contudo, apenas espécies aniônicas foram avaliadas.

MAI et al., (2016) determinaram minerais (cátions – potássio, sódio, cálcio, magnésio, zinco e bário; ânions – cloreto e sulfato) e AOA (piruvato, acetato e lactato) em cerveja (estilo não identificado) utilizando eletroforese capilar “*homemade*”. O equipamento utilizado foi desenvolvido para comportar 3 capilares distintos, cada capilar foi utilizado para determinar uma classe de composto (cátions, ânions inorgânicos e ânions orgânicos), onde foram desenvolvidos três diferentes BGE. A detecção foi realizada por C⁴D e a voltagem utilizado foi de 15 kV. Por mais que a análise tenha sido simultânea, os compostos não foram separados no mesmo capilar, o que ocasionou na determinação dos analitos em três diferentes tempos, além de utilizar três diferentes BGE diferente, contribuindo para a geração de resíduos e o aumento no número de análises experimentais.

Uma técnica favorável e ainda pouco explorada para a determinação simultânea de cátions e ânions é a injeção por ambas as extremidades do capilar (DOEI, do inglês, *Dual Opposite-End Injection*). Nesse modo, a amostra é introduzida em ambas as extremidades do capilar, os cátions são introduzidos na extremidade anódica e os ânions na extremidade

catódica, e quando é aplicada uma diferença de potencial migram em direções opostas à injeção, e conseqüentemente todos os analitos passam pelo detector (SÁIZ et al., 2014).

No estudo de Guo, Guo e Chen (2019) os autores quantificaram 3 ânions inorgânicos e 8 cátions inorgânicos, além de 10 amins biogênicas e 16 aminoácidos em cervejas. A injeção dos analitos foi realizado por ambas as extremidades do capilar (DOEI) com o propósito de determinar diferentes classes de compostos simultaneamente e com um menor tempo de análise. O eletrólito foi composto por 2,5 mmol L⁻¹ de ácido acético, pH 2,1. A tensão aplicada foi de 18 kV, a fim de minimizar a comigração dos analitos de interesse. O método foi aplicado em 21 cervejas diferentes (estilos não identificados). Embora o método tenha sido eficiente na determinação de 37 íons, o tempo de corrida foi muito longo (22 minutos), visto que o objetivo do estudo foi determinar várias classes de compostos simultaneamente (minerais, amins biogênicas e aminoácidos). O método avaliou minerais catiônicos e aniônicos, contudo, não avaliou nenhum AOA, o que poderia ter agregado valor ao trabalho.

A partir do Quadro 1, diversas estratégias foram propostas para análise simultânea de cátions e ânions em cervejas, incluindo modificações do BGE, direção e velocidade do EOF, injeção da amostra por ambas as extremidades do capilar, entre outras características, a fim de separar diferentes classes de compostos e otimizar o tempo total de corrida.

Contudo, os estudos citados ainda não determinaram simultaneamente os analitos de interesse do método a ser proposto, Soga e Ross (1997) e Klampfl e Katzmayr (1998) não determinaram nenhum mineral catiônico. MAI et al., (2016) utilizou um equipamento *homemade*, com aumento na geração de resíduos e experimentos e Guo, Guo e Chen (2019) não determinou nenhum AOA.

Apesar de poucos estudos que contemplem estratégias para análise simultânea de substâncias com caráter aniônico e catiônico em eletroforese capilar, são evidentes as vantagens proporcionadas quanto à redução do emprego de reagentes e conseqüentemente dos resíduos gerados, aumento da frequência analítica, entre outras. Diante disso e do fato de até o presente momento não ter sido encontrados artigos científicos que tenham como objetivo a determinação simultânea dos minerais catiônicos (potássio, sódio, cálcio, e magnésio) e aniônicos (cloreto, nitrato, sulfato, e fosfato) e AOA (oxálico, pirúvico, málico, cítrico, láctico, succínico e acético) em cervejas utilizando eletroforese capilar com detecção UV/Vis, o presente trabalho busca desenvolver e validar uma nova metodologia com a finalidade de determinar esses analitos simultaneamente em um tempo de análise rápido e a mínima geração de resíduos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todas as soluções padrões foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, E.U.A.). Padrões de nitrato de sódio, fosfato de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, imidazol, metanol e dos ácidos fórmico, 3,5-dinitrobenzóico, cítrico, málico, láctico, succínico, acético, pirúvico e oxálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.), todos com pureza superior a 98%. Hidróxido de sódio (NaOH) utilizado para condicionamento do capilar foi adquirido 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

Padrões de nitrato de sódio, fosfato de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e dos ácidos fórmico, cítrico, málico, láctico, succínico, acético, pirúvico e oxálico, em solução aquosa foram preparados na concentração de 100 mmol L⁻¹, enquanto a solução de imidazol foi preparada na concentração de 200 mmol L⁻¹ e o ácido 3,5-dinitrobenzóico, empregado como padrão interno, em 1000 mg L⁻¹ utilizando metanol como solvente. Todas as soluções preparadas foram armazenadas sob refrigeração em temperatura de 4 ± 2 °C até o momento da análise, sendo gradualmente diluídas até as concentrações requeridas para o preparo das curvas de calibração.

Para o preparo das curvas de calibração todas as concentrações foram consideradas em mmol L⁻¹ e preparadas em seis níveis de concentração – 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mmol L⁻¹ para todos os analitos, e a concentração do padrão interno fixa em 5 mmol L⁻¹ em todas as injeções. As curvas de calibração foram preparadas em três réplicas independentes e injetadas aleatoriamente.

O BGE utilizado foi preparado no início de cada dia de trabalho, sendo composto por ácido fórmico 50 mmol L⁻¹, imidazol 45 mmol L⁻¹ e MeOH 5%, pH 4,62. O ácido 3,5-dinitrobenzóico foi utilizado como I.S. na concentração final de 5 mmol L⁻¹.

3.3 Amostras e preparo de amostras

Cinco amostras de cervejas de marcas nacionais, do tipo *Pilsen*, sendo três puro malte, ou seja, compostas por água, malte, lúpulo e levedura, e as outras duas contendo água, malte, lúpulo, levedura e cereais não malteados, acondicionadas em latas com capacidade para 350 mL e com graduação alcóolica de 4,6%, foram adquiridas no comércio local de Florianópolis (SC) e mantidas em temperatura ambiente até o momento das análises. Todas as amostras foram preparadas em triplicata de preparo obedecendo o prazo de validade.

Após a abertura das embalagens as amostras foram transferidas para tubos do tipo *falcon* com capacidade para 15 mL e submetidas a banho de ultrassom por 20 min, para degaseificação, e após transferidas para microtubos de polipropileno de 2 mL para centrifugação por 5 min a 15.000 rpm e diluídas com a solução do padrão interno na proporção de 9:1 (v/v) e então injetadas no sistema de CE. A Figura 15 ilustra as etapas contempladas no preparo das amostras.

Figura 15 - Representação esquemática do preparo das amostras para injeção no sistema de eletroforese capilar.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

3.4 Instrumental

Os experimentos foram conduzidos em sistema de CE modelo 7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos, controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (HP ChemStation[®]).

No início de cada dia, o capilar foi condicionado externamente por método de lavagem manual com microseringa, utilizando solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (20 min), seguido de água

desionizada (20 min) e internamente (no equipamento) com BGE (30 min). Entre as corridas, o capilar foi lavado com o BGE por 150 segundos, e ao final de cada dia, fez-se lavagem com água (10 min).

As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida com comprimento de 60 cm (comprimento efetivo de 8,5 cm para o outlet e 51,5 cm para o inlet, 75 μm d.i. x 375 μm d.e.), com injeção dos padrões e amostras pelas duas extremidades do capilar, com pressão hidrodinâmica (50 mbar por 3 segundos), a tensão aplicada na separação foi 15 kV, modo de detecção indireto, em 215 nm e 450 nm de referência e a temperatura mantida a 25°C.

3.5 Planejamento fatorial 2^3

As melhores condições para o eletrólito de corrida foram investigadas por meio de planejamento fatorial 2^3 , cujas variáveis estudadas foram: tensão aplicada (kV); concentração de metanol no BGE (%), relação imidazol/ácido fórmico (mmol L^{-1}). As variáveis foram escolhidas com base em testes preliminares, e seus níveis correspondentes estão representados na Tabela 2. Foram preparadas três repetições do ponto central (0) e todas as injeções foram realizadas aleatoriamente.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização do eletrólito de corrida.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
1	Tensão (kV)	10	15	20
2	Metanol (%)	2,5	5	7,5
3	[mmol L^{-1} imidazol]/[mmol L^{-1} ác. fórmico]	40/45	45/50	50/55

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A razão entre o número de analitos separados e o tempo total de corrida, gerada a partir da Equação 1, foi considerada a resposta para cada experimento do planejamento fatorial. Os modelos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% e as melhores condições para o eletrólito de corrida definidas por meio da análise dos coeficientes do modelo.

$$R = \frac{\text{Número de analitos separados}}{\text{Tempo total de corrida}} \quad \text{Equação 1}$$

3.6 Análise e tratamento dos resultados

Todas as injeções foram realizadas em triplicatas independentes, no nível de confiança de 95% e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou CV%. O tratamento dos dados foi conduzido empregando os softwares: *Statistic* (versão 10.0) e Microsoft Excel (versão 2016).

3.7 Validação analítica

A fim de garantir a confiabilidade do método desenvolvido para determinação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em cervejas, os parâmetros de validação analítica linearidade, efeito de matriz, seletividade, preciso, exatidão e robustez foram avaliados com base nas recomendações da Eurachem (EURACHEM, 2014) e a conformidade do sistema. Os limites de detecção e quantificação foram avaliados de acordo com método descrito por Faria et al. (2008).

3.7.1 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV %) a partir da média obtida em dez injeções consecutivas, utilizando uma mistura dos padrões (0,3 mmol L⁻¹) 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.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo: S, desvio padrão; \bar{x} , média.

3.7.2 Faixa de trabalho e linearidade

A linearidade foi avaliada a partir de curvas de calibração em solução padrão preparadas em três réplicas independentes (para concentrações das soluções consultar seção 3.2). Todas as soluções foram injetadas de forma aleatória.

Os parâmetros das curvas de calibração foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), o qual requer que as premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos sejam atendidas. Com base nos resultados obtidos fez-se a regressão linear e o gráfico dos resíduos a fim de verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*). Após a inspeção visual, os possíveis *outliers* foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação, sendo aceitável a remoção de valores discrepantes em até 22,2 % do total de dados avaliados (GRUBBS, 1969).

Para verificar se as premissas referentes ao MMQO estavam sendo atendidas, os resíduos também foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), homoscedasticidade pelo teste de Cochran (COCHRAN, 1941), independência a partir do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1950) e para o ajuste ao modelo linear foi empregado o teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989), para todos os testes aplicados foi considerado o nível de confiança de 95%.

3.7.3 Efeito de matriz

O estudo do efeito de matriz foi realizado a partir do método de adição de padrão em uma amostra de cerveja, devido a impossibilidade de se encontrar uma amostra branca.

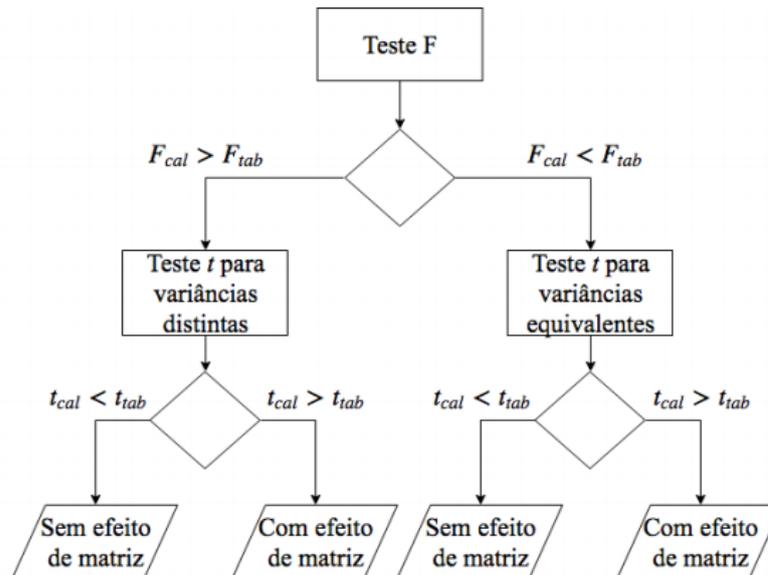
Para avaliação do efeito de matriz foram construídas curvas de calibração em matriz em seis níveis de concentração (0,05-0,5 mmol L⁻¹), consistindo na adição de concentrações conhecidas de solução de padrões dos analitos à amostra, preparadas em três réplicas independentes e analisadas de forma aleatória.

Para verificação do ajuste ao modelo linear, os mesmos testes estatísticos aplicados à curva de solução padrão foram repetidos para a curva de matriz, em relação à presença de *outliers* e quanto às premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos e ajuste ao modelo linear.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio da comparação dos coeficientes angulares da curva de calibração em solução aquosa com os coeficientes angulares das curvas

de calibração em matriz, avaliada estatisticamente pela aplicação do teste *t-Student*. No entanto, para definir o tipo de teste *t* a ser empregado, foi utilizado o teste *F*, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16 - 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, é confirmada a diferença entre as variâncias, sendo indicada a aplicação do teste *t* para variâncias distintas, caso contrário recomenda-se a utilização do teste *t* para variâncias equivalentes. A seguir, se *t* calculado for menor que *t* tabelado não há diferença entre as variâncias e conseqüentemente não há efeito de matriz (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

3.7.4 Seletividade

A seletividade do método proposto foi verificada a partir de experimentos simulados pelo *software PeakMaster*[®]. Estudos como o de Azevedo et al., (2014) e Della Betta et al., (2016) comprovam a confiabilidade do *software PeakMaster*[®] na realização da seletividade. A partir da simulação empregando o eletrólito de corrida e os parâmetros de separação foi possível prever a possibilidade se outros íons potencialmente presentes nas amostras poderiam atuar

como interferentes durante as análises. Entre os íons que teoricamente poderiam atuar como possíveis interferentes destacam-se os ácidos tartárico, ascórbico, sórbico e butírico. A seletividade teórica do método foi estabelecida pela separação em linha de base dos compostos incluídos no método, constatado a partir do eletroferograma simulado.

3.7.5 Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada a partir de três injeções da solução dos padrões dos analitos em três concentrações (0,2, 0,3, e 0,5 mmol L⁻¹), adicionados do I.S. no mesmo dia, enquanto a precisão inter-ensaio foi avaliada da mesma maneira que a precisão intra-ensaio, no entanto em três dias diferentes. Todas as soluções foram preparadas pelo mesmo analista, em três réplicas independentes e injetadas de forma aleatória. Os resultados foram avaliados a partir do CV (%) para os parâmetros: área corrigida (área analito/área I.S.) e tempo de migração corrigido (tempo analito/tempo I.S.).

3.7.6 Exatidão

Para verificação da exatidão realizou-se testes de recuperação aparente de amostras fortificadas em três níveis de concentração: níveis 3 (baixo), 4 (médio) e 6 (alto), em seis réplicas independentes injetadas de forma aleatória. Para os cálculos de recuperação da amostra utilizou-se a Equação 3.

$$Rec (\%) = \frac{C \text{ amostra fortificada} - C \text{ amostra não fortificada}}{C \text{ adicionada na fortificação}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde C é a concentração.

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

Para avaliação do LOD e LOQ do método foram empregadas as equações 4 e 5, a partir da curva de calibração em solução aquosa, de acordo com Faria et al., (2008). Para a avaliação foi utilizado o menor nível da curva de calibração dos analitos.

$$LOD = \frac{3 \times Sb \times Cs}{H_{max} - H_{min}} \quad \text{Equação 4}$$

$$LOQ = \frac{10 \times Sb \times Cs}{H_{max} - H_{min}} \quad \text{Equação 5}$$

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

3.7.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de um delineamento experimental (YOUNDEN; STEINER, 1975). Sete parâmetros foram selecionados, entre os quais: tensão; temperatura do cartucho; pH do BGE; pressão de injeção; tempo de injeção; comprimento de onda e tempo de lavagem entre as corridas. Tais condições foram avaliadas com base nos experimentos nominais, ou seja, aquelas utilizadas no método de análise; e condições alteradas, aplicando as pequenas variações para os parâmetros citados anteriormente. O delineamento experimental empregado na condução do teste de robustez com os parâmetros analíticos avaliados para as condições nominais (letras maiúsculas) e alteradas (letras minúsculas) são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 - Delineamento experimental empregado no teste de *Youden*.

Parâmetros analíticos	Condição experimental							
	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
Resultados	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 4 - Parâmetros analíticos avaliados no teste de *Youden*, condições nominais e alteradas.

Parâmetros analíticos	Condição experimental							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tensão (kV)	15	15	15	15	14	14	14	14
pH	4,62	4,62	4,48	4,48	4,62	4,62	4,48	4,48
Temperatura (°C)	25	26	25	26	25	26	25	26
Pressão (mbar)	50	50	52	52	52	52	50	50
Comprimento de onda (nm)	450	448	450	448	450	448	450	450
Lavagem entre corridas (s)	120	110	110	120	120	110	110	120
Tempo de injeção (s)	3	4	4	3	4	3	3	3
Resultados	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A fim de avaliar o efeito de cada parâmetro e estimar a robustez do método proposto, a média dos quatro valores nominais de concentração foi subtraída da média dos quatro valores de concentração correspondentes às condições alteradas. Um exemplo do cálculo para a avaliação do parâmetro pH é apresentado na Equação 6.

$$B - b = \frac{(s+t+w+x)}{4} - \frac{(u+v+y+z)}{4} \quad \text{Equação 6}$$

3.7.9 Determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em amostras de cerveja

Após o desenvolvimento do método e validação analítica, cinco amostras de cervejas de marcas nacionais do tipo *pilsen*, sendo três puro malte, ou seja, constituídas por água, malte, lúpulo e levedura, e as outras duas contendo como ingredientes água, malte, lúpulo, levedura e cereais não malteados foram analisadas pelo método proposto. Todas as amostras estavam acondicionadas em latas com capacidade para 350 mL, com graduação alcóolica de 4,6% e dentro do prazo de validade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do eletrólito de corrida

A partir da literatura científica, sabe-se que grande maioria dos cátions metálicos não apresentam absorção na região do espectro UV-Vis, sendo assim a eletroforese capilar apresenta vantagens em relação a outras técnicas de separação, uma vez que, utilizando o modo indireto de detecção é possível separar essas espécies inorgânicas. Para a aplicação desse modo de detecção é necessário que ao menos um componente do eletrólito de corrida seja cromóforo, e dentre os mais utilizados para análise de cátions são as aminas protonadas, tais como imidazol e fenilamina (JAGER; TAVARES, 2001). É importante ressaltar que os ácidos orgânicos alifáticos de baixa massa molar também apresentam baixa absorvidade molar na região do UV-Vis.

A separação dos analitos de interesse neste estudo foi simulada com o auxílio do *software Peakmaster*[®], considerando o modo de detecção indireto. Para seleção adequada dos componentes do BGE foram avaliadas diversas características imprescindíveis para uma boa separação dos analitos. As características desejáveis incluem boa capacidade tamponante e escolha de co-íon e contra-íon adequados a fim de minimizar a assimetria das bandas e efeitos de dispersão. A partir do *Peakmaster*[®], foi possível obter os valores de pKa e mobilidade efetiva (μ) dos analitos, os quais podem ser visualizados na Tabela 5.

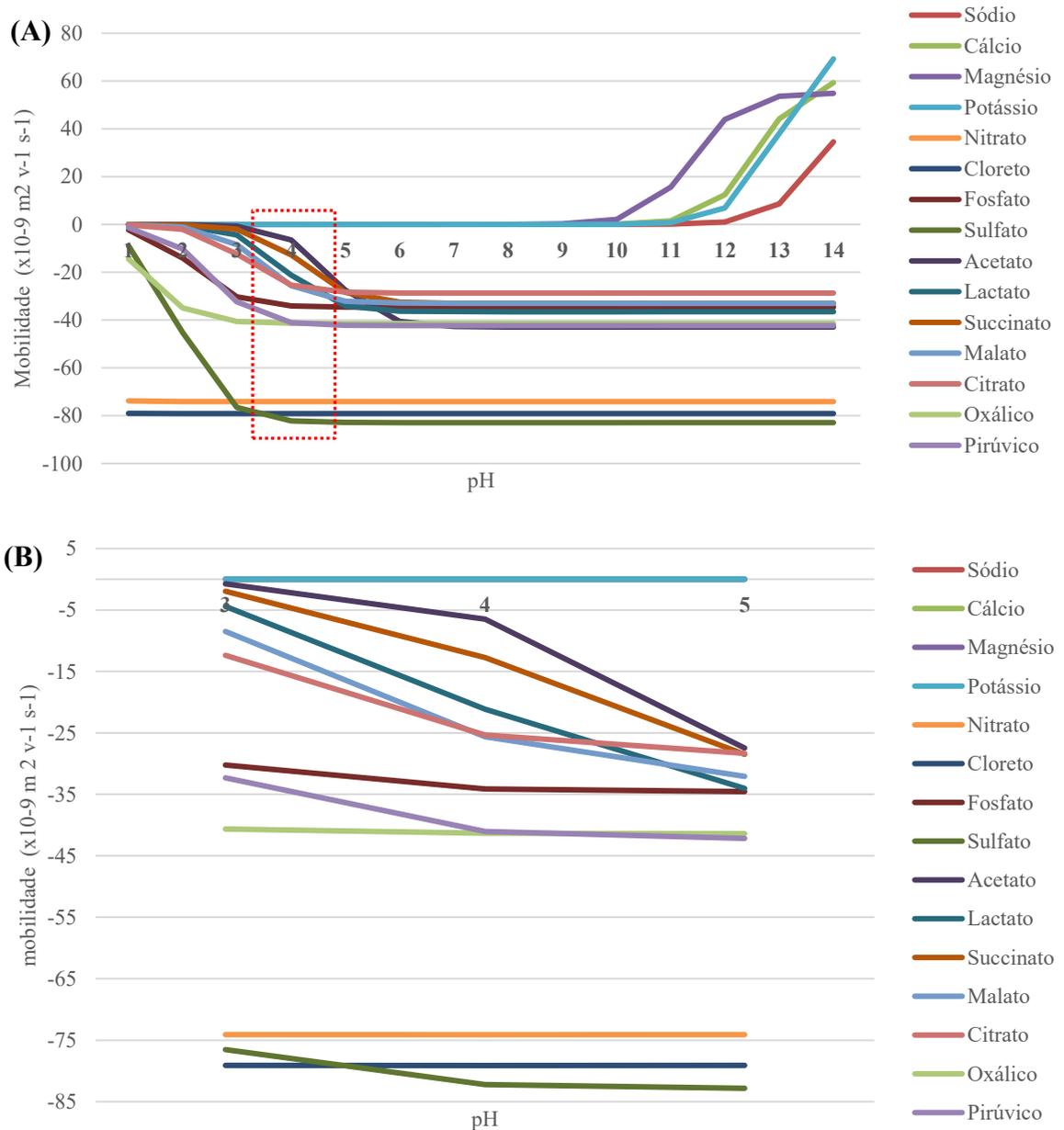
Tabela 5 - Dados de pKa e mobilidade dos analitos objeto de estudo.

Analito	pKa	μ ($\times 10^{-9}$ m² V⁻¹ s⁻¹)
CÁTIONS		
Sódio	13,7	51,9
Cálcio	12,6	61,7
Magnésio	11,4	55
Potássio	13	76,2
Mobilidade média: cátions		61,2
ÂNIONS		
Nitrato	-1,37	-74,1
Cloreto	-2	-79,1
Fosfato	-2,16	-34,6
Sulfato	-1,92	-82,9
Lático	-3,86	-36,5
Succínico	-4,2	-33
Málico	-3,46	-33
Cítrico	-3,12	-28,7
Oxálico	-1,271	-41,4
Pirúvico	-2,49	-42,3
Mobilidade média: ânions		-48,04
Média total		54,62

Fonte: *Software PeakMaster*[®] versão 5.4.

Uma vez que o objetivo principal desse estudo foi desenvolver um método de separação simultânea de cátions e ânions, a injeção foi realizada por ambas extremidades do capilar. De acordo com a curva de mobilidade efetiva *versus* pH (Figura 17) foi possível escolher um intervalo de pH abaixo de 5, mas não inferior a 3. Neste intervalo de pH o fluxo eletrosmótico não exercerá efeito na mobilidade dos analitos, uma vez que apresenta baixa magnitude em faixas de pH inferiores a 5.

Figura 17 - Curva de mobilidade efetiva dos minerais e AOA *versus* pH para escolha do pH do eletrólito de corrida, onde (A) pH de 1 a 14; (B) pH na região favorável.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Figura 17 foi possível perceber que os cátions inorgânicos (Na, Ca, Mg e K) apresentaram valores de mobilidade efetiva igual a zero até valores de pH próximos a 11,5, demonstrando dificuldade de desenvolver um método para determinação simultânea de cátions e ânions, uma vez que acima de pH 11,5 haveria comigração da maioria dos analitos aniônicos.

É importante destacar que as mobilidades eletroforéticas são constantes físicas tabeladas, e determinadas para espécies totalmente dissociadas ou ionizadas ($\alpha = 1$) e extrapoladas para diluição infinita (LAUER; ROZING, 2009), ou seja, na prática a mobilidade eletroforética difere da mobilidade determinada experimentalmente, especialmente quando a espécie iônica é resultado da dissociação de um ácido fraco ou base fraca. Isso acontece porque nesses casos existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada, ou seja, com mobilidade zero, e o seu ácido ou base conjugado, cada um com valor de mobilidade particular.

Por outro lado, devido ao elevado potencial de ionização (PI) – definido por Pearson (VOGEL, 1981) como a facilidade da espécie em doar elétrons – os cátions metálicos Na, K, Ca e Mg comportam-se como ácidos de Lewis, formando complexos com moléculas de água em solução aquosa, assumindo portanto a mobilidade do complexo durante a separação eletroforética. Segundo a definição de Tiselius qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade. Essa mobilidade é denominada de mobilidade efetiva (μ_{ef}), a qual descreve a migração de íons dissociados de ácidos ou bases fracos (TAVARES, 1996). Frente ao exposto, os cátions metálicos considerados nesse estudo não possuirão mobilidade zero durante o intervalo de pH considerado para a separação de todos os analitos.

Ainda, de acordo com a Figura 17, foi possível perceber que a faixa de pH entre 3,5 e 4,8 foi a região em que os analitos aniônicos apresentaram diferenças entre suas mobilidades, mas não tão significativas que poderiam tornar a corrida muito longa. É importante ressaltar que não é possível realizar a previsão precisa do pH adequado para a separação de todos os analitos uma vez que os dados utilizados no cálculo da mobilidade efetiva estão corrigidos para diluição infinita, condição que não corresponde exatamente à separação experimental.

A escolha dos componentes do BGE foi realizada com auxílio do *software PeakMaster*[®]. Para exercer a função do cromóforo foi escolhido o imidazol (com mobilidade $52 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) pois, além de apresentar mobilidade eletroforética próxima à média dos analitos (mobilidade $54,62 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), esta substância possui absorvidade molar na região do UV-Vis, imprescindível para a detecção no modo indireto.

A fim de manter a capacidade tamponante do meio adequada, foi escolhido o ácido fórmico, visto que seu pKa (3,7) é próximo ao pH ideal observado, sendo adequado para garantir a repetibilidade das separações, evitando fenômenos que possam prejudicar a eficiência

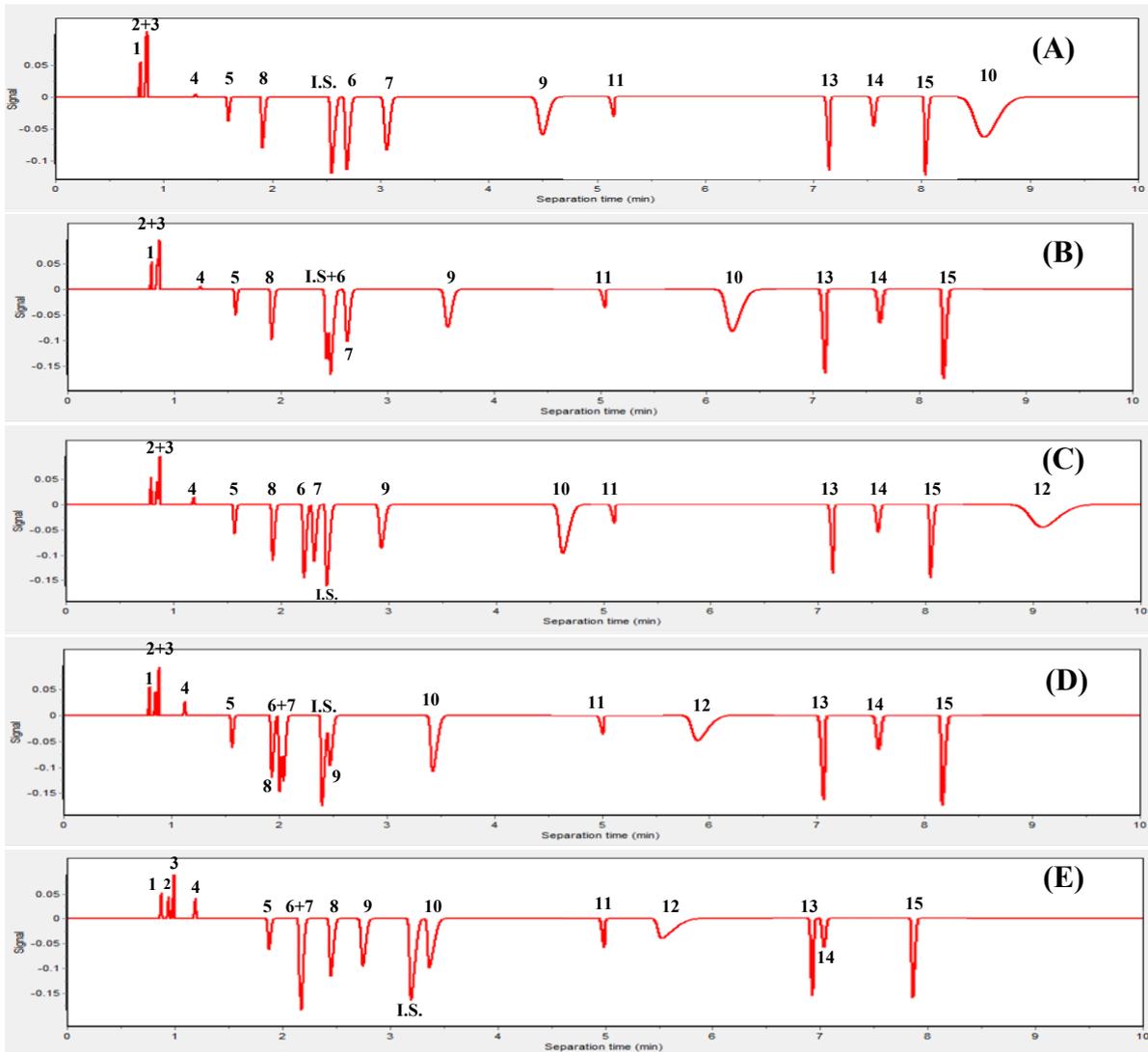
do método, como por exemplo, a eletrólise, além de também possuir mobilidade similar aos analitos ($56,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

O I.S. escolhido foi o ácido μ 3,5-dinitrobenzóico, mesmo com mobilidade de $29,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, relativamente baixa em relação à média dos analitos, esse ácido possui pKa de 2,824, estando ionizado no pH ideal, além de não estar presente em amostras de cerveja e ter demonstrado uma separação efetiva nas simulações com o auxílio do *software Peakmaster*[®].

4.1.1 Ensaios preliminares ao planejamento fatorial

A partir da constatação do intervalo de pH adequado para a separação, as concentrações dos constituintes do BGE foram avaliadas a partir de experimentos preliminares envolvendo simulação das corridas com auxílio do *software Peakmaster*[®]. A concentração do ácido fórmico foi fixada em 45 mmol L^{-1} e a concentração do imidazol variou de 20 a 40 mmol L^{-1} (com intervalos de 5 mmol L^{-1}), conforme pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Eletroferogramas da separação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos no *software PeakMaster*[®], Condição: 45 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e (A) 20 mmol L⁻¹; (B) 25 mmol L⁻¹; (C) 30 mmol L⁻¹; (D) 35 mmol L⁻¹; (E) 40 mmol L⁻¹ de imidazol, respectivamente. A tensão foi ajustada para 15 kV. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) láctico, (IS) 3,5 dinitrobenzóico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio.



Fonte: *Software PeakMaster*[®] versão 5.4.

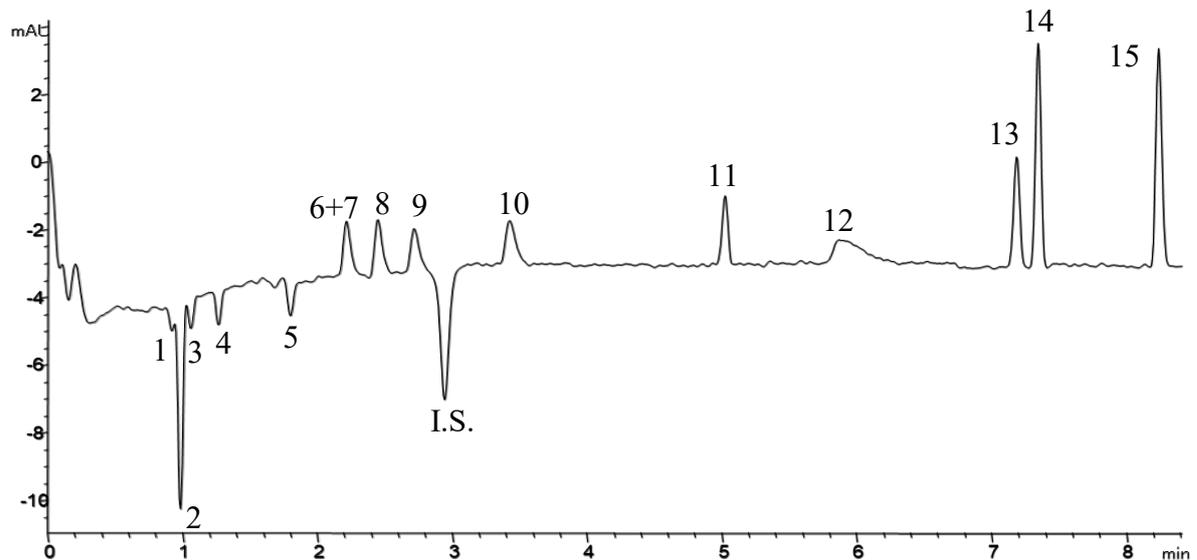
A partir da Figura 18, foi possível observar que o aumento da concentração de imidazol proporcionou uma melhora na separação dos analitos, além de provocar uma pequena redução no tempo de corrida. Sendo assim, a condição do eletroferograma simulado “E” com 40 mmol L⁻¹ de imidazol, demonstrou ser a melhor condição de análise, entre as condições avaliadas.

Ainda, é possível observar que apesar de seguir diversos critérios para a escolha adequada dos componentes do BGE, as condições de separação não foram suficientes para promover a separação dos ácidos cítrico e málico. Contudo, verificou-se que quanto maior a força iônica, maior era a separação dos demais analitos, principalmente os ânions inorgânicos cloreto, nitrato e sulfato.

Com o aumento da força iônica maior a quantidade de íons no meio de separação, conseqüentemente um aumento da condutividade e aumento da densidade da corrente gerada pela aplicação da diferença de potencial, o que gerou efeito Joule. Conseqüentemente, o aumento da corrente pode levar à depleção do BGE por meio da eletrólise, sendo necessário uma reposição frequente do BGE, sendo assim, a aplicação de tensões mais baixas evita a geração de calor excessivo no capilar e por consequência a depleção do BGE é minimizada. As variações de tensões aplicadas nas simulações demonstraram que este é um parâmetro que interfere diretamente no tempo e resolução dos picos. Além disso, uma estratégia muito utilizada para a separação de picos adjacentes que não alcançam resolução adequada durante a separação é o emprego de solventes orgânicos, que agem na solvatação dos íons em solução e podem causar uma melhora na separação, com destaque para os ácidos cítrico e málico, que durante a simulação não apresentaram resolução em linha de base. Entretanto, não é possível prever por meio de simulação o comportamento do uso de solventes orgânicos, uma vez que estes efeitos não são previstos pelo “software” de simulação.

De qualquer forma é importante enfatizar que mesmo sem a possibilidade de simulação de todos os experimentos até a escolha dos parâmetros de separação satisfatórios à determinação dos analitos de interesse, ainda assim é muito conveniente a utilização do *software Peakmaster*[®] para auxiliar na condução do desenvolvimento do método, mesmo que de forma parcial, evidenciando a importância desta ferramenta explorada em separações por CZE. O eletroferograma experimental referente à condição “E” com 40 mmol L⁻¹ de imidazol, pode ser visualizado a partir da Figura 19.

Figura 19 - Eletroferogramas experimental da separação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos em solução padrão. Condição: 45 mmol L⁻¹ de ácido fórmico, 40 mmol L⁻¹ de imidazol e 5% de MeOH, pH 4,57, 15kV. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) lático, (IS) 3,5 dinitrobenzóico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio.



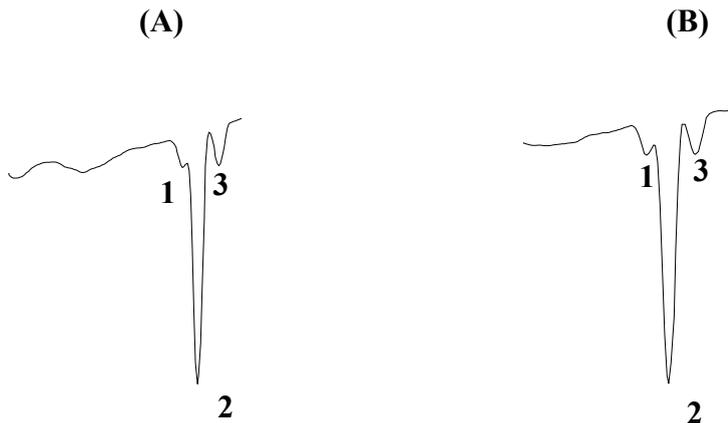
Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

É possível observar no eletroferograma experimental que os ânions inorgânicos cloreto e nitrato não apresentaram separação em linha de base, e, que nos eletroferogramas simulados, mesmo sem a possibilidade de incluir o solvente orgânico, foi observado que quanto maior a concentração de imidazol, uma melhora significativa era observada na separação dos mesmos. Sendo assim, foi preparado outro eletrólito com um aumento proporcional entre a relação imidazol/ácido fórmico, passando de 40/45 para 45/50 mmol L⁻¹, respectivamente, a fim de manter o pH próximo ao anterior.

Além disso, é importante ressaltar que estudos preliminares já haviam demonstrado a eficiência da adição de metanol na separação dos cátions sódio e cálcio, em diferentes concentrações, assim como o efeito causado pela mudança na tensão aplicada durante a separação (dados não mostrados).

A seguir, a Figura 20 mostra o eletroferograma constituído por 45 mmol L⁻¹ de imidazol, 50 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e 5% de metanol, sendo possível constatar a diferença da separação, mesmo que sutil, dos ânions inorgânicos quando comparado o BGE com a relação imidazol/ácido fórmico composto por 40/45 e 45/50 mmol L⁻¹, respectivamente.

Figura 20 - Separação dos ânions inorgânicos cloreto e nitrato, Onde: (1) cloreto; (2) nitrato; (3) sulfato. Condição de separação: (A) Relação imidazol/ácido fórmico 40/45 mmol L⁻¹ e 5% de metanol (pH 4,57); (B) Relação imidazol/ácido fórmico 45/50 mmol L⁻¹ e 5% de metanol (pH 4,62), ambos com 15 kV. Comprimento até o detector: 8,5 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Com a constatação das variáveis que influenciavam na separação dos analitos e no tempo de análise, optou-se por desenvolver um planejamento fatorial, a fim de determinar a melhor concentração do eletrólito de corrida, minimizando o empirismo que envolve o desenvolvimento de métodos por meio de experimentos de tentativa e erro.

4.1.2 Planejamento fatorial 2³

A fim de obter a composição do eletrólito de corrida mais adequado para a separação dos 15 analitos de interesse, aliando resolução satisfatória e menor tempo de análise, foi aplicado um planejamento fatorial 2³ com três repetições do ponto central. As variáveis, níveis de estudo e respostas geradas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis reais e codificados das variáveis e respostas do planejamento fatorial 2³.

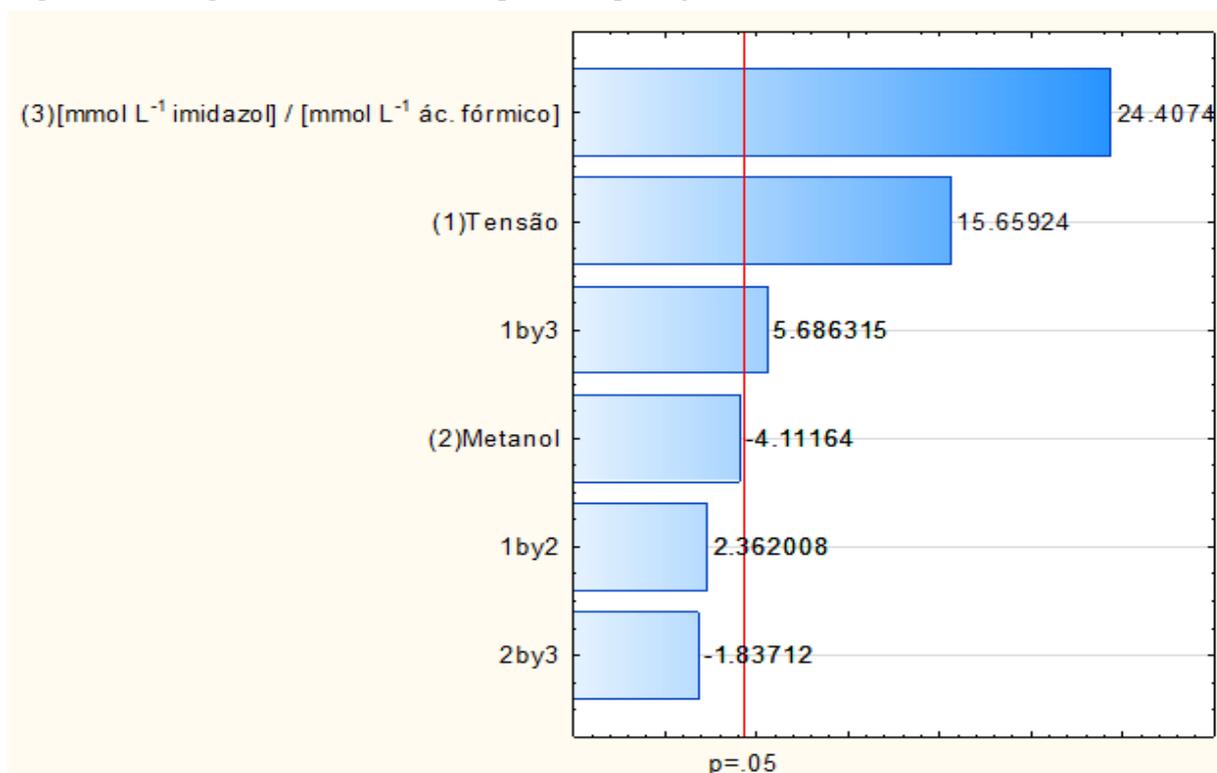
EXP	Tensão (kV)	Metanol (%)	[mmol L ⁻¹ imidazol] / [mmol L ⁻¹ ác. fórmico]	Número de analitos separados	t (min)	Resposta
1	10 (-1)	2,5 (-1)	40/45 (-1)	09	12,5	0,72
2	15 (0)	5,0 (0)	45/50 (0)	15	8,0	1,87
3	20 (+1)	2,5 (-1)	40/45 (-1)	06	7,0	0,85
4	10 (-1)	7,5 (+1)	50/55 (+1)	15	13,9	1,07
5	20 (+1)	7,5 (+1)	40/45 (-1)	08	8,5	0,94
6	10 (-1)	2,5 (-1)	50/55 (+1)	15	12,2	1,22
7	20 (+1)	7,5 (+1)	50/55 (+1)	10	6,0	1,66
8	15 (0)	5,0 (0)	45/50 (0)	15	8,0	1,87
9	20 (+1)	2,5 (-1)	50/55 (+1)	10	5,4	1,85
10	10 (-1)	7,5 (+1)	40/45 (-1)	09	18	0,50
11	15 (0)	5,0 (0)	45/50 (0)	15	7,7	1,94

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: EXP = Experimento. Resposta = Número de analitos dividido pelo tempo.

A resposta do planejamento fatorial foi gerada a partir da razão entre o número total de analitos separados e tempo final da análise (tempo de retenção do último analito observado na corrida), conforme descrito na seção 3.5. As variáveis que influenciaram significativamente a separação dos analitos e o tempo de análise estão apresentadas no diagrama de Pareto (Figura 21).

Figura 21 - Diagrama de Pareto da resposta do planejamento fatorial.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Como observado na Figura 21, as variáveis independentes [mmol L⁻¹ imidazol] / [mmol L⁻¹ ác. fórmico], tensão e a interação entre elas tiveram efeito significativo nas separações dos analitos e no tempo de análise.

A relação entre as concentrações dos componentes do BGE imidazol e ácido fórmico, correspondentes ao pH de trabalho, teve um efeito significativo positivo nas separações e consequentemente nas respostas. O pH influencia a protonação e/ou desprotonação dos analitos, na intensidade do fluxo eletrosmótico e consequentemente no tempo de separação, e na dispersão por eletromigração (EMD) dos picos, resultando na alteração da simetria dos picos (TAVARES, 1997). Todos os experimentos com a relação 50/55 evidenciaram melhores respostas quando comparados aos experimentos com a relação 40/45.

A tensão aplicada teve um efeito positivo em relação ao tempo de análise e consequentemente em relação a resposta. A velocidade de migração dos analitos é dependente da intensidade do campo elétrico aplicado. O campo elétrico, por sua vez, é determinado pela magnitude do potencial elétrico aplicado e do comprimento sobre o qual é aplicado. Quanto

maior o potencial elétrico, maior é a velocidade de migração das espécies iônicas, consequentemente, menor o tempo de análise.

Os eletroferogramas dos experimentos 1, 4, 6 e 10 apresentaram os maiores tempos de análise, que é explicado pelo fato de ter sido aplicada a menor tensão nesses experimentos (10 kV). Nos experimentos 4 e 6, foi possível separar, com exceção dos ácidos cítrico e málico, todos os demais analitos de interesse, porém com maior tempo de análise, o que não é favorável, por limitar a frequência analítica do método.

A variável independente metanol não foi significativa ($p = 0,054$) e apresentou influência negativa. A presença de metanol no BGE, tem como objetivo modificar as propriedades físico-químicas do meio, controlar o fluxo eletrosmótico e proporcionar melhora na seletividade (JAGER; TAVARES, 2001). Contudo, o aumento da concentração do metanol influenciou o tempo final de corrida, sendo possível observar a partir da comparação dos experimentos 1, 3, 6 e 9, com os experimentos 10, 5, 4 e 7, respectivamente. As condições de tensão e pH eram as mesmas, apenas foi alterada a concentração de metanol e os experimentos 10, 5, 4 e 7 apresentaram maiores tempos de análise em comparação com os experimentos em que a quantidade de metanol era menor. O valor de $p = 0,054$ para a variável metanol, próximo ao limite estabelecido pelo intervalo de confiança escolhido (95%) justifica estes resultados.

A análise de variância (ANOVA) para as respostas obtidas está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância das respostas do planejamento fatorial 2^3 .

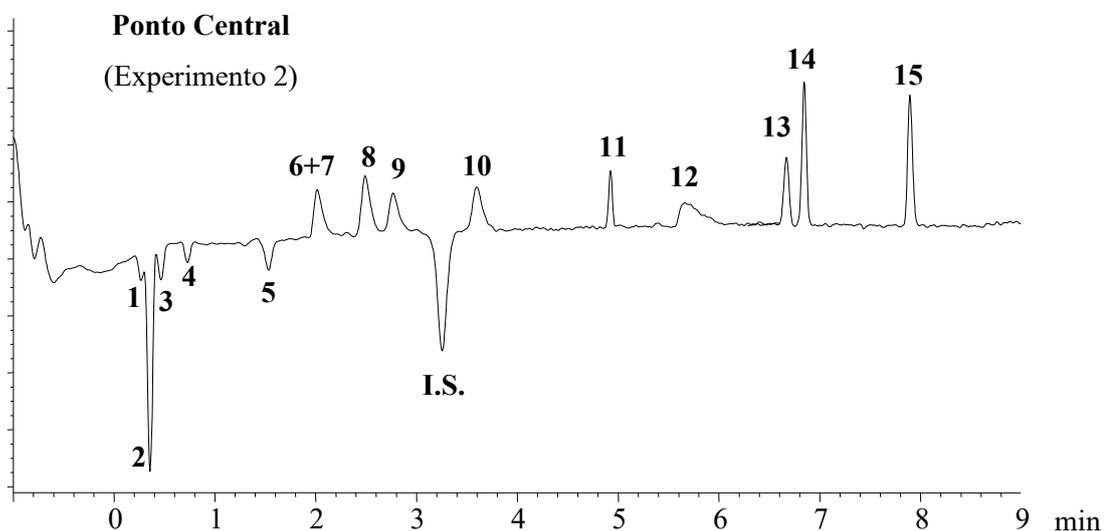
Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	0,65	6	0,11	0,31	6,16	0,0506
Resíduos	1,39	4	0,35			
Falta de ajuste	1,384177	2	0,69	423,73	19	22,3014
Erro puro	0,003267	2	0,00			
Total	2,037099	10				

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: nível de significância $\alpha=0,05$; R^2 : 51%.

A partir da análise de variância, foi verificado a falta de ajuste para o modelo matemático no intervalo de confiança estipulado, visto que F calculado foi maior que F tabelado, não sendo possível avaliar os resultados por meio de superfície de resposta. Contudo, a partir dos eletroferogramas obtidos e da análise influenciados coeficientes dos modelos para as variáveis estudadas, foi possível concluir que as injeções referentes ao ponto central foram as que revelaram as melhores respostas. Logo, as condições referentes ao experimento do ponto central foram consideradas satisfatórias para a separação, pois apresentaram o menor tempo de análise e o maior número de analitos de interesse separados, como observado a partir da Figura 22.

Figura 22 - Eletroferograma do ponto central resultante do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata. Onde: (1) cloreto (2) nitrato, (3) sulfato (4) oxálico, (5) pirúvico, (6) cítrico (7) málico (8) fosfato (9) láctico, (IS) 3,5 dinitrobenzôico, (10) succínico, (11) potássio (12) acético, (13) cálcio, (14) sódio, (15) magnésio. Condição de separação: 45 mmol L⁻¹ de imidazol, 50 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e 5% de MeOH. pH 4,62, 15 kV, capilar de 60 cm. Injeção por ambas as extremidades.



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Embora as injeções referentes ao ponto central demonstrem respostas satisfatórias, é possível observar na Figura 22, que os ácidos cítrico e málico não foram separados. Ainda

assim, diante das condições de análise avaliadas, essa composição de BGE foi considerada adequada à separação simultânea de cátions e ânions por eletroforese capilar.

Nesse estudo, o emprego da simulação em eletroforese capilar e delineamento experimental foram muito úteis para a definição dos parâmetros experimentais adequados para alcançar a separação simultânea de analitos catiônicos e aniônicos, uma vez que eram previstas dificuldades relacionadas ao objetivo, principalmente devido à complexidade do método. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, ampliando o delineamento experimental, a fim de conseguir ajustar o modelo linear e identificar uma composição de BGE com capacidade para separar os ácidos cítrico e málico.

4.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Uma vez definidas as condições experimentais relacionadas ao método de separação, foram definidos os parâmetros de validação intralaboratorial do método para determinação simultânea de minerais aniônicos, catiônicos e AOA em amostras de cervejas comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, de acordo com recomendações da Eurachem (2014), a saber: linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão e robustez. A conformidade do sistema, os limites de detecção e quantificação foram avaliados de acordo com Faria, Souza e Oliveira, (2008).

4.2.1 Conformidade do sistema

Os resultados para a conformidade do sistema foram expressos como valores de CV % e podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da conformidade do sistema para os minerais e ácidos orgânicos alifáticos em solução aquosa.

Analito	Área corrigida (CV %)	Tempo corrigido (CV %)	Analitos	Área corrigida (CV %)	Tempo corrigido (CV %)
Cloreto	4,71	0,23	Lático	3,86	0,37
Nitrato	4,42	0,20	Succínico	3,82	0,54
Sulfato	4,99	0,20	Potássio	3,94	0,11
Oxálico	3,83	0,22	Acético	4,89	0,99
Pirúvico	4,68	0,22	Sódio	4,93	0,13
Cit. + Mal.	4,86	0,33	Cálcio	3,96	0,13
Fosfato	3,49	0,30	Magnésio	3,98	0,13

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: Tempo corrigido ($\text{tempo}_{\text{analito}}/\text{tempo I.S.}$); Área corrigida ($\text{área}_{\text{analito}}/\text{área I.S.}$), $n=10$.

Os resultados de CV (%) observados na Tabela 8 para a área corrigida, variaram de 3,49 a 4,99 %, e para o parâmetro tempo corrigido de 0,11 a 0,99 %. Os pequenos valores de coeficientes de variação demonstram que o sistema instrumental empregado para as análises era adequado e poderia ser utilizado no procedimento de validação.

Após a análise dos resultados experimentais, embora o ácido acético tenha sido separado, o alto valor de EMD poderia comprometer a quantificação devido à dificuldade de integração das áreas desse analito. Sendo assim, esta substância não foi considerada durante o procedimento de validação e tampouco na quantificação das amostras avaliadas.

Ainda, como mencionado anteriormente nos ensaios preliminares ao planejamento fatorial (seção 4.1.1), o método proposto não foi capaz de separar os ácidos cítrico e málico, entretanto, esses dois ácidos foram considerados como a soma de seus resultados. No decorrer do texto a expressão “Cit.+ Mal.” será referente ao tratamento de dados dos dois ácidos em conjunto.

4.2.2 Linearidade

A partir dos resultados obtidos experimentalmente, foram construídas as curvas de calibração dos analitos em solução aquosa. Todas as curvas de calibração apresentaram coeficientes de determinação (R^2) maior ou igual a 0,99. As curvas de calibração dos analitos em solução aquosa são apresentadas na Figura 23.

Figura 23 - Curvas de calibração dos analitos em solução aquosa.

(continua)

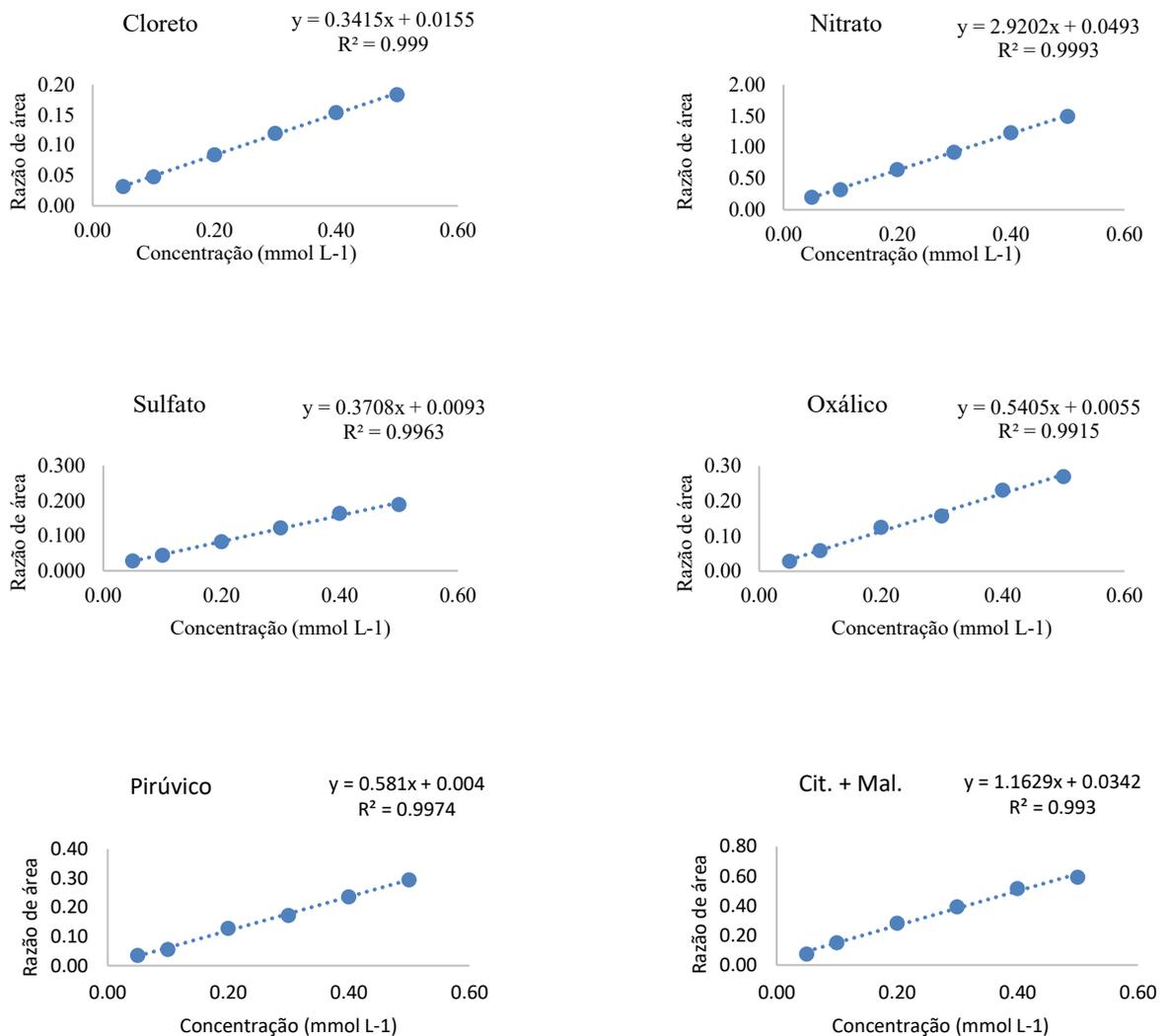
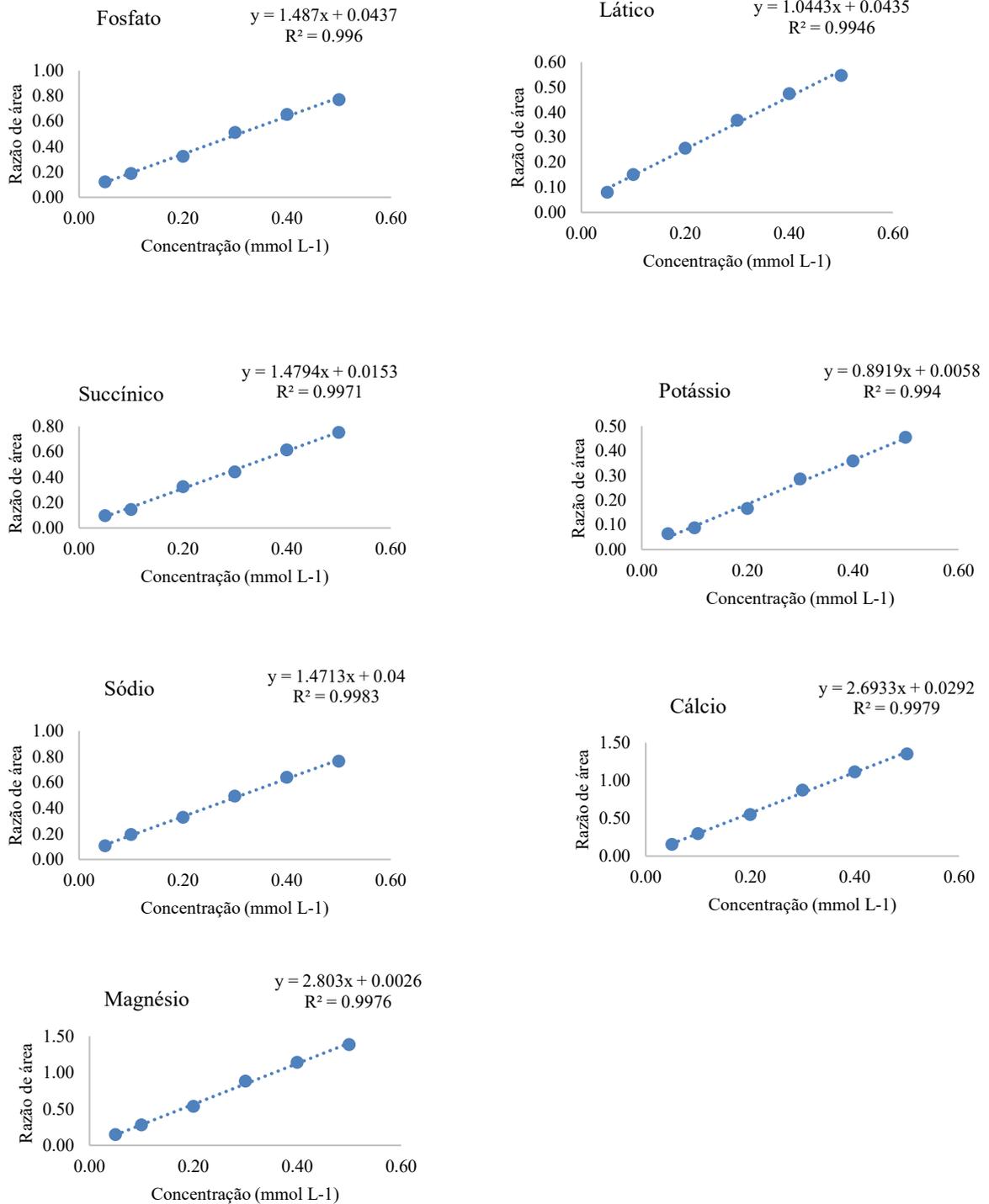


Figura 23 - Curvas de calibração dos analitos em solução aquosa.

(conclusão)



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A partir do gráfico dos resíduos da regressão, foram identificados possíveis *outliers* para todos os analitos por meio da inspeção visual e estes foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação (GRUBBS, 1969). Após a aplicação do teste de Grubbs, foi confirmado para o nitrato, ácido succínico, potássio, cálcio e magnésio a presença de *outlier* na curva aquosa. Não foi confirmado a presença de *outliers* para os demais analitos.

Quando a presença de *outliers* foi confirmada, estes valores foram retirados respeitando o valor máximo de exclusão de dados de 22,2% (GRUBBS, 1969). A partir disso, foi possível visualizar os resíduos da curva aquosa, de acordo com a Figura 24.

Figura 24 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva aquosa.

(continua)

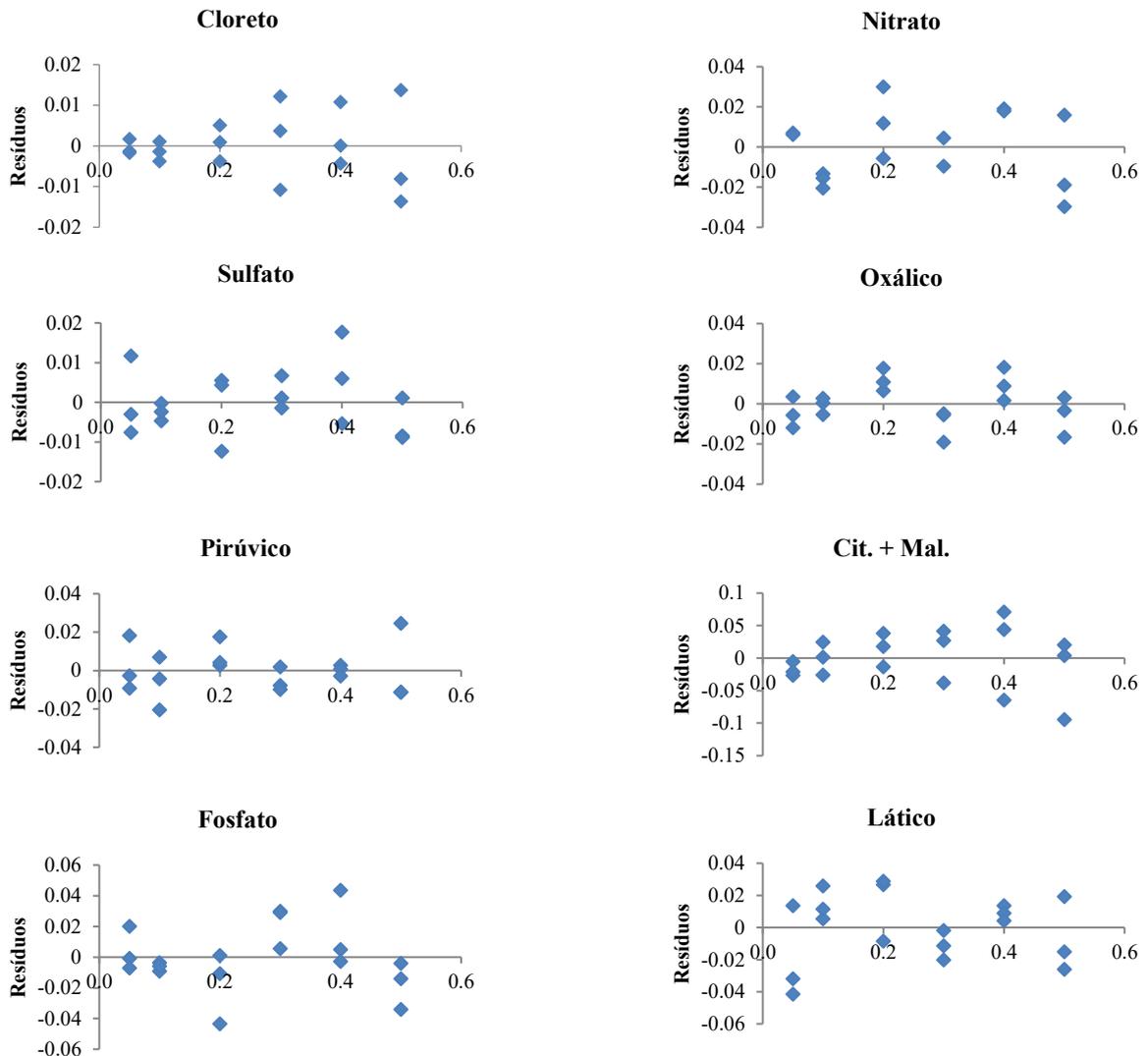
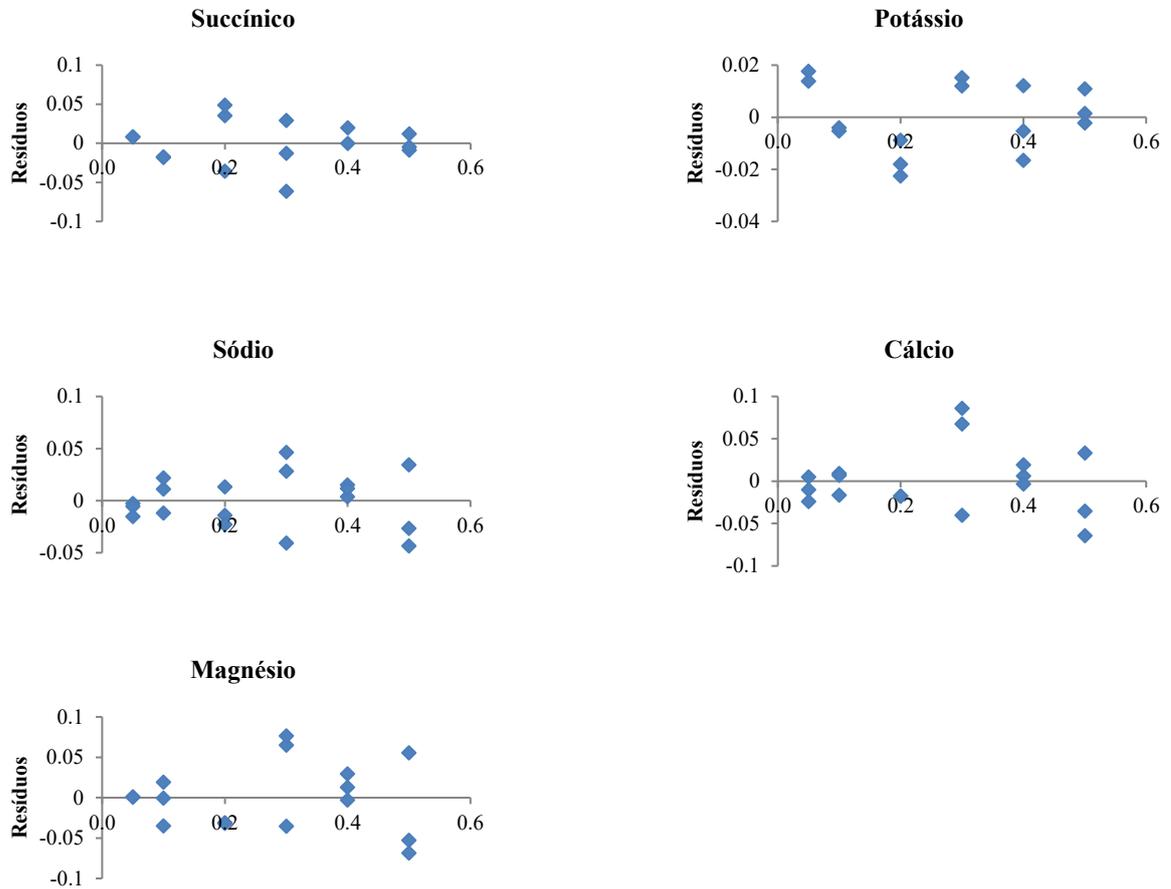


Figura 24 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva aquosa.

(conclusão)



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Para verificar a distribuição normal dos resultados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva aquosa.

Analito	<i>p</i> calculado
Cloreto	0,69
Nitrato	0,96
Sulfato	0,82
Oxálico	0,82
Pirúvico	0,49
Cit. + Mal.	0,86
Fosfato	0,34
Lático	0,77
Succínico	0,98
Potássio	0,23
Sódio	0,96
Cálcio	0,39
Magnésio	0,67

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: *p* tabelado, 0,05.

Os resultados que apresentaram valor de *p* calculado maior que o *p* tabelado (0,05) são considerados normais (SHAPIRO; WILK, 1965), assim, de acordo com a Tabela 9, observou-se que os resíduos da regressão foram provenientes de uma distribuição normal. Após confirmada a normalidade dos dados, foi verificada a homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene (LEVENE, 1960) como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva aquosa.

Analito	<i>p</i> calculado
Cloreto	0,52
Nitrato	0,44
Sulfato	0,78
Oxálico	0,95
Pirúvico	0,84
Cit. + Mal.	0,78
Fosfato	0,83
Lático	0,88
Succínico	0,49
Potássio	0,47
Sódio	0,57
Cálcio	0,52
Magnésio	0,70

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: *p* tabelado, 0,05.

Se *p* calculado for maior que *p* tabelado, indica que os dados são homoscedásticos, ou seja, que a variância dos resíduos da regressão não diferem entre si (LEVENE, 1960). A seguir, foi verificada a independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1950) e os resultados podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva aquosa.

Analito	DW	Resultado
Cloreto	2,57	Independência
Nitrato	1,58	Independência
Sulfato	2,03	Independência
Oxálico	2,06	Independência
Pirúvico	1,86	Independência
Cit. + Mal.	2,11	Independência
Fosfato	1,55	Independência
Lático	2,01	Independência
Succínico	2,62	Independência
Potássio	1,72	Independência
Sódio	3,47	Dependência
Cálcio	2,98	Dependência
Magnésio	2,94	Dependência

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Os valores DW foram comparados com os seus respectivos valores tabelados de dL , dU , $4-dU$ e $4-dL$ e classificados conforme a condição em que se adequavam: se $0 \leq DW < dL$, indica dependência; se $dL \leq DW \leq dU$, indica inconclusividade; se $dU < DW < 4-dU$, indica independência; se $4-dU \leq DW \leq 4-dL$, indica inconclusividade; se $4-dL < DW \leq 4$, indica dependência (DURBIN; WATSON, 1950). A partir da avaliação dos dados, sódio, cálcio e magnésio indicaram autocorrelação dos resíduos, ou seja, dependência.

Contudo, por meio da aplicação de teste F de Fisher-Snedecor, que assume que a normalidade, independência e homoscedasticidade da variância dos resíduos sejam válidos, foi verificado o ajuste ao modelo linear dos dados, como é possível observar na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do teste F para avaliação do ajuste ao modelo linear das curvas aquosa.

Analito	F calculado	F tabelado
Cloreto	926,08	1,16
Nitrato	10,113	1,13
Sulfato	994,8	1,16
Oxálico	1165,5	1,16
Pirúvico	101,2	1,16
Cit. + Mal.	341,8	1,16
Fosfato	2103,2	1,16
Lático	983,65	1,16
Succínico	926,9	1,13
Potássio	1645,8	1,13
Sódio	1477,3	1,16
Cálcio	2216,2	1,15
Magnésio	1679,6	1,14

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, foi verificado que não há falta de ajuste ao modelo linear, uma vez que F calculado foi maior que F tabelado. A partir da verificação de todas as premissas concluiu-se que o modelo aplicado às curvas aquosas de todos os analitos na faixa de trabalho estudada foi linear.

4.2.3 Efeito de matriz

Devido à complexidade da matriz em estudo e a impossibilidade de encontrar uma amostra branca, ou seja, isenta dos analitos de interesse, as curvas de calibração da matriz foram construídas com o emprego do método de adição de padrão em uma amostra de cerveja do tipo *pilsen*.

A partir do gráfico dos resíduos da regressão, foram identificados possíveis *outliers* para todos os analitos por meio da inspeção visual e estes foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação (GRUBBS, 1969). Após a aplicação do teste de Grubbs, foi confirmada a presença de *outliers* para o ácido succínico, potássio, sódio e cálcio na curva em matriz, para os demais analitos a presença de *outliers* não foi confirmado. Quando a presença de *outliers* foi confirmada, estes valores foram excluídos respeitando o valor máximo de exclusão de dados de 22,2% (GRUBBS, 1969). Os resíduos das curvas de calibração construídas em matriz estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva em matriz.

(continua)

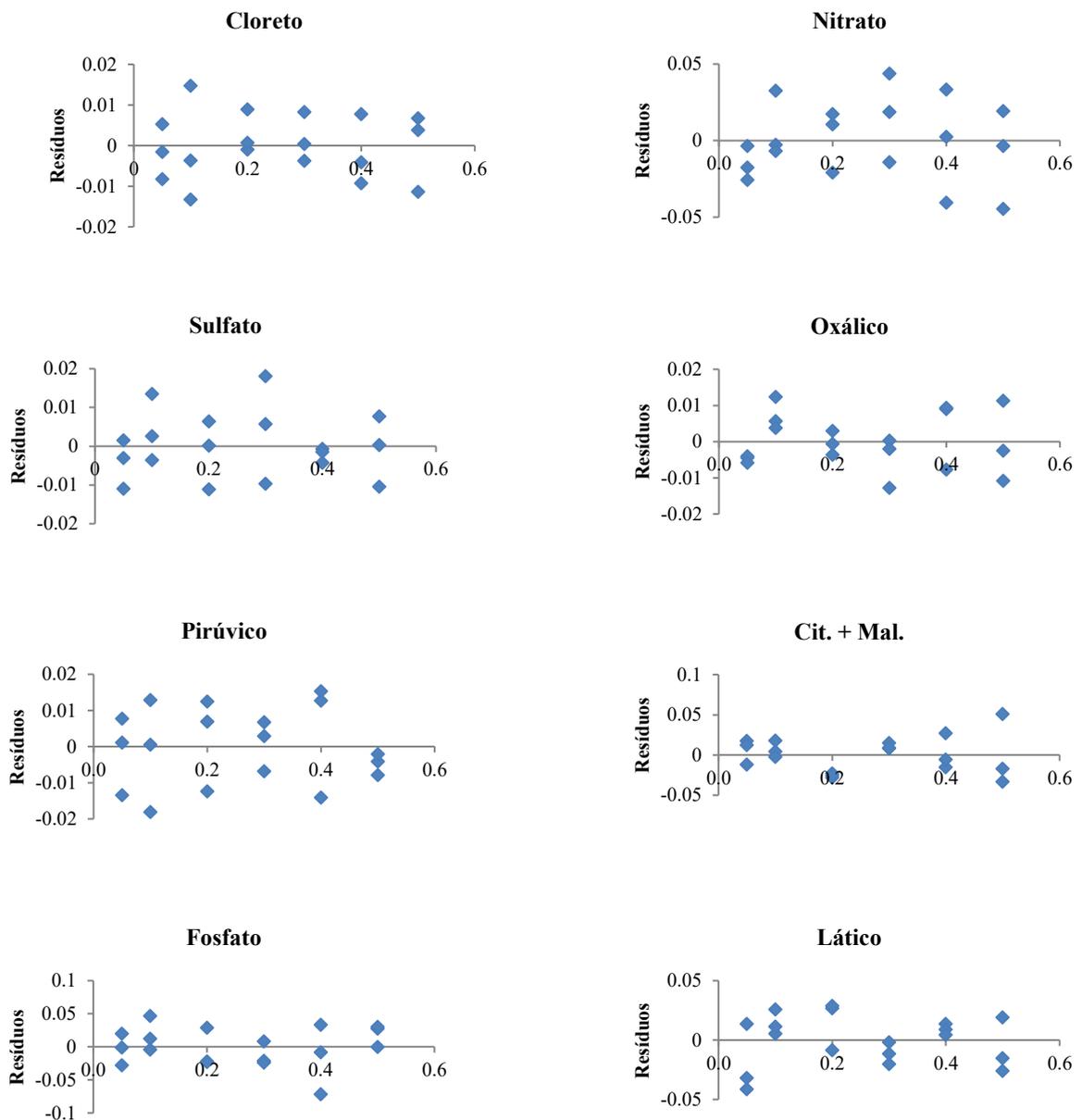
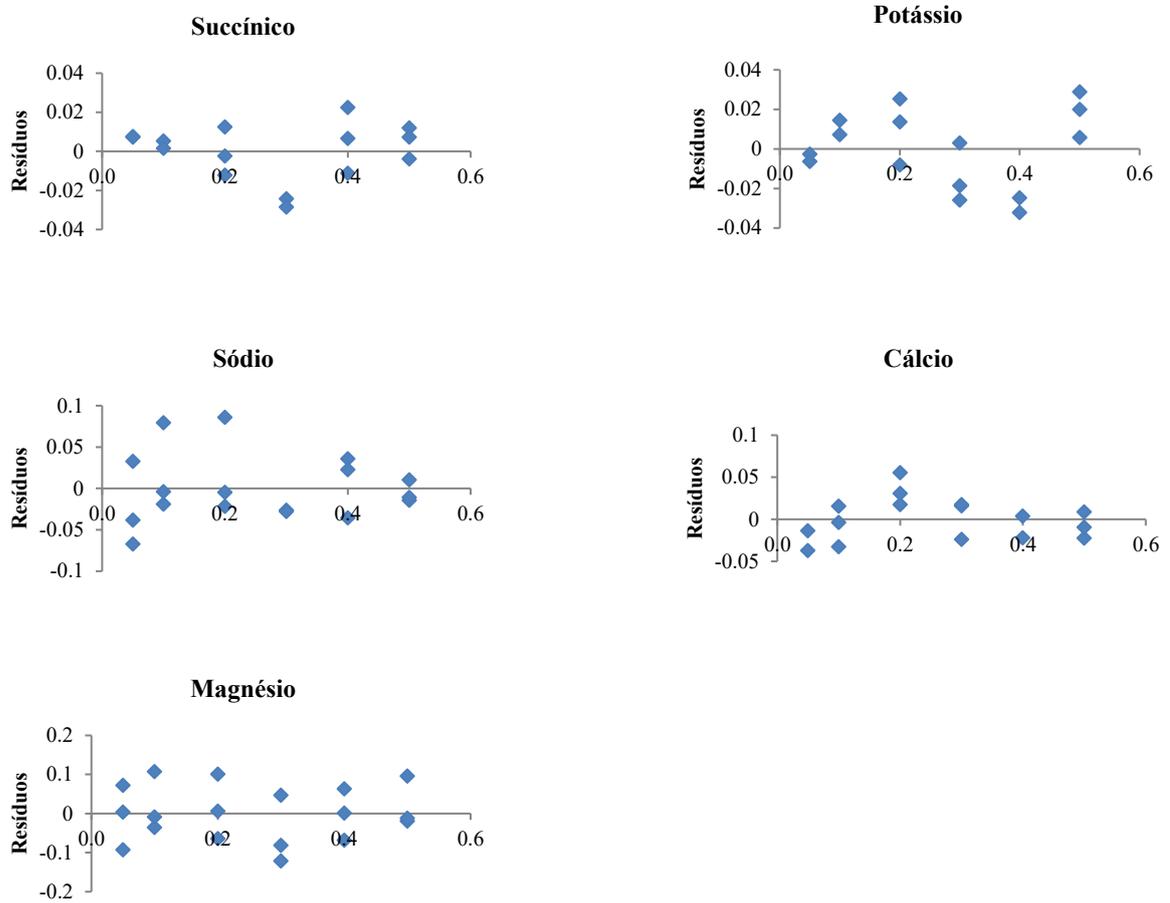


Figura 25 - Gráficos de resíduos para avaliação da regressão linear da curva em matriz.

(conclusão)



Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Para verificar a distribuição normal dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk e os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos da regressão da curva em matriz.

Analito	<i>p</i> calculado
Cloreto	0,89
Nitrato	0,91
Sulfato	0,43
Oxálico	0,71
Pirúvico	0,38
Cit. + Mal.	0,66
Fosfato	0,45
Lático	0,48
Succínico	0,30
Potássio	0,68
Sódio	0,21
Cálcio	0,64
Magnésio	0,52

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: *p* tabelado, 0,05.

Foram considerados normais, os dados que apresentaram o valor de *p* calculado maior que o *p* tabelado (0,05), sendo assim, de acordo com a Tabela 13, observou-se que os resíduos da regressão são provenientes de uma distribuição normal. Após confirmada a normalidade dos dados, foi verificada a homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene, como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva em matriz.

Analito	<i>p</i> calculado
Cloreto	0,86
Nitrato	0,84
Sulfato	0,62
Oxálico	0,71
Pirúvico	0,84
Cit. + Mal.	0,47
Fosfato	0,59
Lático	0,80
Succínico	0,54
Potássio	0,40
Sódio	0,80
Cálcio	0,97
Magnésio	0,51

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: *p* tabelado, 0,05.

A partir da Tabela 14, foi verificado valor de *p* calculado maior que o *p* tabelado (0,05) para todos os analitos, demonstrando que a variância dos resíduos da regressão não difere entre si e representam resultados homoscedásticos. Após, foi verificada a independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson e os resultados podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva em matriz.

Analito	DW	Resultado
Cloreto	2,30	Independência
Nitrato	2,14	Independência
Sulfato	2,28	Independência
Oxálico	1,68	Independência
Pirúvico	2,96	Dependência
Cit. + Mal.	1,51	Independência
Fosfato	2,35	Independência
Lático	2,02	Independência
Succínico	2,04	Independência
Potássio	1,30	Inconclusivo
Sódio	2,41	Independência
Cálcio	1,26	Inconclusivo
Magnésio	2,44	Independência

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Os valores DW foram comparados com os seus respectivos valores tabelados de dL , dU , $4-dU$ e $4-dL$ e classificados conforme a condição em que se adequavam: se $0 \leq DW < dL$, indica dependência; se $dL \leq DW \leq dU$, indica inconclusividade; se $dU < DW < 4-dU$, indica independência; se $4-dU \leq DW \leq 4-dL$, indica inconclusividade; se $4-dL < DW \leq 4$, indica dependência. A partir da avaliação dos dados, o ácido pirúvico indicou autocorrelação dos resíduos, ou seja, dependência, e o potássio e cálcio, inconclusividade.

Para verificar o ajuste ao modelo linear dos dados, foi aplicado o teste F de Fisher-Snedecor, observar demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados do teste F para avaliação do ajuste ao modelo linear das curvas em matriz.

Analito	F calculado	F tabelado
Cloreto	646,6	1,16
Nitrato	6840,4	1,16
Sulfato	1034,5	1,16
Oxálico	2262,2	1,16
Pirúvico	1396,1	1,16
Cit. + Mal.	1267,4	1,16
Fosfato	1072,2	1,16
Lático	1091,23	1,16
Succínico	3086,8	1,16
Potássio	1058,8	1,16
Sódio	585,8	1,16
Cálcio	4553,2	1,14
Magnésio	787,5	1,16

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Os resultados apresentados na Tabela 16 demonstraram que não foi constatada 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 foi confirmado como linear para as curvas de calibração em matriz na faixa de trabalho estudada.

Por fim, para avaliação do efeito de matriz comparou-se a inclinação da curva aquosa e em matriz e, a partir do teste F , foi verificada a homogeneidade das variâncias, Quando F calculado for maior que F tabelado, as variâncias são homogêneas, e então, aplica-se o teste t -*Student* para amostras com variâncias equivalentes. Caso contrário, pode se usar o teste t para as variâncias distintas. O resultado do teste t -*Student* é mostrado na Tabela 17.

Tabela 17 - Verificação do efeito de matriz através do teste de *t-Student*.

Analito	t_{cal}	<	t_{tab}	Resultado
Cloreto	1,47	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Nitrato	2,92	<	4,30	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Sulfato	1,87	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Oxálico	0,10	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Pirúvico	0,58	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Cit. + Mal.	0,37	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Fosfato	0,80	<	3,18	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Lático	0,28	<	4,30	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Succínico	2,31	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Potássio	2,69	<	3,18	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Sódio	0,69	<	3,18	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Cálcio	2,23	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO
Magnésio	2,06	<	2,77	$t_{cal} < t_{tab}$, não rejeita HO

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: Hipótese HO = não há efeito de matriz.

A partir da Tabela 17, foi observado que a matriz não interferiu no sinal analítico, visto que, o t calculado foi menor que t tabelado. Desse modo, a quantificação dos analitos nas amostras foi realizada a partir das curvas de calibração utilizando padrões em meio aquoso.

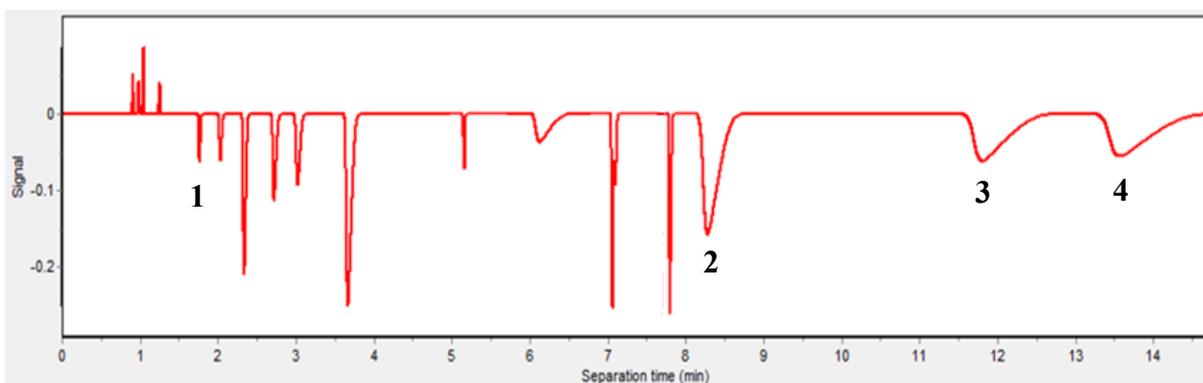
4.2.4 Seletividade

Nas amostras de cervejas estão presentes muitas espécies que poderiam interferir na determinação de minerais e ácidos orgânicos alifáticos por CE, no entanto, essas espécies devem estar ionizadas e possuir características compatíveis com as condições empregadas no

método para detecção no pH de separação. Os interferentes considerados foram os ácidos orgânicos tartárico, ascórbico, sórbico e butírico.

A partir dos ensaios preliminares no desenvolvimento do método, descritos na seção 4.2.1, as simulações no *software PeakMaster*[®] apresentaram grande similaridade com os resultados experimentais, contribuindo para minimizar a geração de resíduos e o número de análises experimentais. Com isso, a partir de novas simulações *software PeakMaster*[®] pode-se confirmar que na condição simulada nenhum deles interfere na determinação dos analitos de interesse, permitindo a separação de todos os possíveis interferentes na condição do método proposto, como mostrado na Figura 26.

Figura 26 - Seletividade simulada no software *PeakMaster*[®], Legenda: (1) ácido tartárico; (2) ácido ascórbico; (3) ácido sórbico; (4) ácido butírico, Condições de separação simuladas: 45 mmol L⁻¹ de imidazol e 50 mmol L⁻¹ de ácido fórmico, pH 4,62, 15 kV, capilar 60 cm. Injeção por ambas as extremidades.



Fonte: *Software PeakMaster*[®].

É importante ressaltar, que não é possível realizar simulações com o metanol, entretanto, no planejamento fatorial, foi possível observar nos eletroferogramas que a adição de metanol melhorou significativamente a separação dos analitos, influenciando no tempo de análise. Com isso, pressupõe-se que o metanol, na condição simulada, exercerá o mesmo efeito de solvatação dos analitos e alteração da viscosidade do meio, mantendo uma resolução satisfatória, uma vez que na condição sem a adição de solvente orgânico já foi observada a separação completa de todos os analitos avaliados.

4.2.5 Exatidão

A recuperação aparente dos foi avaliada a partir de três níveis de concentração adicionados a uma amostra de cerveja do tipo *pilsen*. As médias dos resultados para a recuperação dos analitos em matriz são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18- Resultados de recuperação aparente em amostra de cerveja em diferentes níveis de fortificação.

Analito	Recuperação %	Recuperação %	Recuperação %
	Baixo (0,2 mmol L ⁻¹)	Médio (0,3 mmol L ⁻¹)	Alto (0,5 mmol L ⁻¹)
Cloreto	99,9 ± 5,9	98,6, ± 6,7	97,7 ± 4,1
Nitrato	103,4 ± 3,4	103,6 ± 3,2	104,2 ± 1,9
Sulfato	98,4, ± 8,8	104,8 ± 9,6	104,8 ± 4,4
Oxálico	105,6 ± 3,9	99,1 ± 3,6	101,7 ± 3,2
Pirúvico	104,4 ± 7,3	102,6 ± 5,5	101,4 ± 0,9
Cit. + Mal.	88,60 ± 2,8	102,9 ± 0,9	99,5 ± 5,4
Fosfato	99,3 ± 4,6	94,06 ± 4,0	92,9 ± 4,7
Lático	106,5 ± 7,0	94,8 ± 3,6	99,6 ± 4,0
Succínico	90,09 ± 4,5	90,1 ± 5,0	86,3 ± 1,3
Potássio	94,7 ± 7,9	95,4 ± 2,6	102,6 ± 3,3
Sódio	100,4 ± 5,9	92,7 ± 6,84	96,8 ± 3,0
Cálcio	108,9 ± 2,8	103,2 ± 3,2	103,8 ± 1,1
Magnésio	110,0 ± 3,2	106,1 ± 7,11	110,5 ± 1,3

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Tabela 18 foi observado que os resultados de recuperação aparente variaram de 88,6 a 110,0% para o nível baixo, 90,1 a 106,1 % para o nível médio e 86,3 a 110,5 % para alto de concentração. Na Tabela 19, 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 19 - Valores recomendados aceitáveis de resultados de recuperação expressos em faixas de concentração.

Concentração (C)	Intervalo de recuperação (%)
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	90 a 107
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	95 a 105

Fonte: AOAC (2012) e BRASIL (2011).

A partir dos resultados, podemos observar que o nível mais baixo avaliado para a soma dos ácidos cítrico e málico (88,60 %) apresentou resultado abaixo do limite inferior de recuperação (90 %), o que pode ser explicado pela comigração desses analitos, o que pode ter causado interferências não apenas nos resultados de exatidão mas em outros parâmetros avaliados anteriormente. Para tanto, é recomendado avaliar a exatidão por outra técnica analítica com outro mecanismo de separação. O ácido succínico também apresentou resultados inferiores aos esperados (86,3 %), enquanto as concentrações recuperadas para o magnésio foram superiores em todos os níveis avaliados. São vários os fatores que podem contribuir para resultados inferiores ou superiores aos limites recomendados, e, neste método especificamente, em que emprega o modo indireto de detecção, em que a identificação dos picos não se baseiam no espectro de absorção, não sendo possível avaliar a pureza do espectro por exemplo, ou ainda, a presença de um padrão interno para todos os analitos, sendo que sua posição no eletroferograma ou até mesmo a carga elétrica pode prejudicar a quantificação de alguns analitos, ainda que seja preferível a sua utilização.

Contudo, apesar de variabilidade entre os valores encontrados e baseado nos valores aceitáveis para recuperação, quase a totalidade dos resultados está dentro dos limites permitidos e pela complexidade da matriz podemos dizer que os resultados são aceitáveis.

4.2.6 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 20.

Tabela 20 - Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio expressos em CV%.

(continua)

Analitos	Concentração (mmol L ⁻¹)	Intra-ensaio (CV %) *		Inter-ensaio (CV %) **	
		Tempo corrigido	Área corrigida	Tempo corrigido	Área corrigida
Cloreto	0,2	0,58	3,64	0,55	3,08
	0,3	0,29	3,67	0,26	3,12
	0,5	0,73	4,89	0,42	3,61
Nitrato	0,2	0,47	0,35	0,53	1,53
	0,3	0,25	1,81	0,17	3,50
	0,5	0,74	0,52	0,39	2,29
Sulfato	0,2	0,48	3,03	0,58	2,88
	0,3	0,22	3,52	0,16	3,68
	0,5	0,68	2,23	0,36	3,33
Oxálico	0,2	0,56	3,71	0,45	3,63
	0,3	0,15	3,97	0,18	4,50
	0,5	0,60	3,14	0,32	4,11
Pirúvico	0,2	0,34	3,88	0,35	3,61
	0,3	0,13	1,75	0,08	1,76
	0,5	0,45	2,92	2,17	3,46
Cit. + Mal.	0,2	0,50	3,89	0,31	2,02
	0,3	0,26	3,95	0,26	4,14
	0,5	0,27	2,44	0,17	2,57
Fosfato	0,2	0,16	3,07	0,17	3,24
	0,3	0,09	1,43	0,08	3,67
	0,5	0,22	1,04	0,11	1,42
Lático	0,2	0,25	2,65	0,19	3,11
	0,3	0,20	3,43	0,18	3,90
	0,5	0,17	3,21	0,10	2,99

Tabela 20 - Resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio expressos em CV%.
(conclusão)

Analitos	Concentração (mmol L ⁻¹)	Intra-ensaio (CV %) *		Inter-ensaio (CV %) **	
		Tempo corrigido	Área corrigida	Tempo corrigido	Área corrigida
Succínico	0,2	0,15	1,82	0,25	2,68
	0,3	0,44	2,80	0,42	3,69
	0,5	0,44	1,84	0,29	2,79
Potássio	0,2	0,65	2,77	0,82	2,70
	0,3	0,30	1,37	0,32	1,55
	0,5	1,24	1,48	0,73	2,65
Sódio	0,2	1,05	3,33	1,84	2,61
	0,3	0,52	3,08	0,40	1,63
	0,5	1,37	3,36	0,80	3,08
Cálcio	0,2	1,08	2,56	1,02	2,61
	0,3	0,53	2,25	0,40	2,02
	0,5	1,39	1,64	0,81	2,18
Magnésio	0,2	1,30	3,29	1,11	2,36
	0,3	0,67	0,67	0,45	1,90
	0,5	1,45	1,17	0,85	2,58

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

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

Na precisão intra-ensaio, para os resultados de tempo corrigidos variaram de 0,09 a 1,45 %, e para área corrigida variaram de 0,35 a 4,89 %. Na precisão inter-ensaio os resultados apresentados variaram de 0,08 a 2,17 % para o tempo corrigido e 1,42 a 4,50 % para área corrigida. Na Tabela 21, são demonstrados os limites máximos de CV aceitáveis conforme a concentração dos analitos na matriz, segundo recomendação da AOAC (AOAC, 2012).

Tabela 21 - Limites de precisão em função da concentração dos analitos.

Concentração (C)	Limite do CV (%)
$10 \text{ mg/kg} \leq C < 100 \text{ mg/kg}$	5,3
$100 \text{ mg/kg} \leq C < 1000 \text{ mg/kg}$	3,7

Fonte: AOAC (2012).

Dentre os analitos de interesse, e de acordo com estudos publicados, os analitos majoritários esperados são fosfato e potássio, sendo que esses analitos apresentaram CV menores que 3,7%, estando dentro do limite aceitável para suas concentrações. Ademais, todos os analitos estão de acordo com o limite de 5,3%, sendo assim, o método apresentou precisão satisfatória para todos os analitos avaliados.

4.2.7 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os resultados de LOD e LOQ obtidos experimentalmente são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados obtidos para os parâmetros LOD e LOQ.

Analito	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	Analitos	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)
Cloreto	0,62	2,07	Lático	0,31	1,06
Nitrato	0,14	0,49	Succínico	2,15	7,16
Sulfato	0,69	2,33	Potássio	0,51	1,71
Oxálico	0,47	1,58	Sódio	0,05	0,18
Pirúvico	0,48	1,60	Cálcio	0,05	0,18
Cit. + Mal.	1,23	4,13	Magnésio	0,06	0,20
Fosfato	0,29	0,99			

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Nesse trabalho o LOD variou de 0,05 a 2,15 mg L⁻¹, os quais correspondem ao sódio/cálcio e ao ácido succínico, respectivamente. Da mesma maneira, ambos os analitos apresentaram os menores e maiores LOQ, variando de 0,18 a 7,16 mg L⁻¹, valores considerados satisfatórios para os níveis esperados dos analitos nas amostras de cerveja.

4.2.8 Robustez

Os resultados da avaliação da robustez obtidos por meio do teste de Youden, onde é avaliado o efeito das alterações realizadas no método sobre o tempo de migração, área, concentração, simetria e resolução dos minerais e ácidos orgânicos alifáticos estão apresentados nas Tabelas 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29.

Tabela 23 - Efeito da variação da tensão na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	-0,0041	0,0045	0,0110	0,1222	-0,0015
Nitrato	-0,0053	0,0168	0,0052	0,0087	-0,0001
Sulfato	-0,0054	-0,0014	-0,0037	0,0012	-0,0005
Oxálico	-0,0055	0,0015	0,0017	0,02725	-0,0003
Pirúvico	-0,0063	-0,0013	-0,0027	-0,078	-0,0025
Cit. + Mal.	-0,0039	-0,0135	-0,0129	0,01125	-0,0018
Fosfato	-0,0052	0,0443	0,0253	-0,0225	0,0031
Láctico	-0,0004	-0,0299	-0,0270	-0,0340	-0,0048
Succínico	0,0089	0,0257	0,0169	-0,0240	0,0011
Potássio	-0,0808	-0,0230	-0,0242	-0,0040	-0,0017
Sódio	-0,1374	-0,0512	-0,0294	0,0005	-0,0037
Cálcio	-0,1414	-0,0546	-0,0167	-0,0122	-0,0022
Magnésio	-0,1702	-0,0186	-0,0364	0,0277	-0,0035

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 24 - Efeito da variação do pH na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	-0,0194	-0,0379	-0,0932	-0,1653	0,0023
Nitrato	-0,0203	-0,2570	-0,0798	0,0022	0,0004
Sulfato	-0,0207	-0,0417	-0,1093	0,0252	0,0027
Oxálico	-0,0341	-0,0678	-0,0749	-0,0163	-0,0001
Pirúvico	-0,0216	-0,0765	-0,1548	0,2905	0,0021
Cit. + Mal.	-0,063	-0,1598	-0,1526	-0,1878	0,0116
Fosfato	-0,0075	-0,1039	-0,0594	-0,082	-0,003
Láctico	-0,0585	0,0995	0,0898	-0,4525	0,0262
Succínico	-0,1287	-0,1459	-0,0957	-0,0655	0,0084
Potássio	-0,2952	-0,2538	-0,2678	0,0235	-0,001
Sódio	-0,4849	-0,4736	-0,2725	0,0160	-0,0024
Cálcio	-0,4978	-0,9055	-0,2781	-0,0193	-0,0025
Magnésio	-0,5878	-0,9973	-0,3064	0,0182	-0,0028

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 25 - Efeito da variação da temperatura na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	-0,0018	0,0210	0,0517	0,1597	0,0006
Nitrato	-0,0021	0,0843	0,0261	0,0007	0,0006
Sulfato	-0,0019	0,0328	0,0861	0,0367	0,0021
Oxálico	-0,0016	0,0258	0,0285	0,0172	0,0011
Pirúvico	-0,0027	0,0344	0,0697	-0,0225	0,0009
Cit. + Mal.	-0,0017	0,0502	0,0480	0,0027	0,0040
Fosfato	-0,0024	0,0743	0,0425	-0,0355	0,0071
Láctico	-0,0003	0,0292	0,0264	-0,0235	0,0018
Succínico	0,0017	0,0809	0,0531	-0,0220	0,0104
Potássio	-0,0349	0,0340	0,0358	0,0390	0,0011
Sódio	-0,0535	0,0526	0,0300	0,0115	0,0007
Cálcio	-0,0556	0,0770	0,0236	-0,0017	0,0003
Magnésio	-0,0640	0,1196	0,0367	-0,0237	0,0016

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 26 - Efeito da variação da pressão na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	0,0054	-0,0265	-0,0652	-0,2482	-0,0016
Nitrato	0,0057	-0,0907	-0,0281	-0,0022	-0,0004
Sulfato	0,0063	-0,011	-0,0314	-0,0267	-0,0004
Oxálico	0,0062	-0,0204	-0,0225	-0,0087	-0,0001
Pirúvico	0,0059	-0,0129	-0,0262	0,0040	-0,0019
Cit. + Mal.	0,0064	0,0024	0,0023	0,0547	-0,0022
Fosfato	0,0068	-0,0692	-0,0396	0,0880	-0,0080
Láctico	0,0017	0,0029	0,0026	0,1030	-0,0020
Succínico	-0,0061	-0,1068	-0,0700	0,0850	-0,0109
Potássio	0,0709	0,0204	0,0215	-0,0140	-0,0001
Sódio	0,1225	0,0093	0,0054	-0,0120	0,0011
Cálcio	0,1262	-0,0112	-0,0034	-0,0112	0,0003
Magnésio	0,1534	-0,0107	-0,0032	0,0147	-0,0003

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 27 - Efeito da variação do comprimento de onda na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	-0,0016	-0,0088	-0,0218	0,1237	0,0001
Nitrato	-0,0018	-0,0742	-0,0230	-0,0037	-0,0007
Sulfato	-0,0011	-0,0237	-0,0623	0,0027	-0,0003
Oxálico	-0,0013	-0,0276	-0,0305	-0,0442	-0,0003
Pirúvico	-0,0007	0,0326	0,0660	0,0050	0,0043
Cit. + Mal.	0,0008	-0,0609	-0,0582	0,0132	-0,0033
Fosfato	0,0008	-0,0241	-0,0137	-0,0245	0,0030
Láctico	0,0007	-0,0425	-0,0384	0,0370	-0,0030
Succínico	0,0007	0,0037	0,0024	-0,0005	0,0004
Potássio	0,0009	-0,0489	-0,0516	-0,0165	-0,0013
Sódio	-0,0003	-0,1065	-0,0613	-0,0185	-0,0005
Cálcio	-0,0006	-0,1677	-0,0515	-0,0057	-0,0001
Magnésio	0,0003	-0,1705	-0,0524	0,0237	-0,0016

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 28 - Efeito da variação do tempo de lavagem na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	0,0019	-0,0203	-0,0500	0,0272	-0,0011
Nitrato	0,0018	-0,0885	-0,0275	-0,0002	0,0002
Sulfato	0,0017	-0,0222	-0,0583	-0,0192	-0,0007
Oxálico	0,0023	-0,0150	-0,0166	0,0042	0,0003
Pirúvico	0,0021	-0,0403	-0,0817	0,0035	0,0001
Cit. + Mal.	0,0029	-0,0274	-0,0262	0,0092	0,0005
Fosfato	0,0025	-0,0657	-0,0375	0,0300	-0,0039
Láctico	0,0017	-0,0508	-0,0458	0,0615	-0,0024
Succínico	0,0012	-0,0238	-0,0156	-0,0330	0,0013
Potássio	0,0367	-0,0335	-0,0353	0,0030	-0,0005
Sódio	0,0640	-0,0958	-0,0551	-0,0220	0,0017
Cálcio	0,0655	-0,1083	-0,0517	-0,0067	0,0001
Magnésio	0,0792	-0,1225	-0,0376	-0,0017	-0,0002

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 29 - Efeito da variação do tempo de injeção na determinação dos tempos de migração, áreas, concentrações, simetria e resolução dos analitos.

Analito	Tempo	Área	Concentração	Simetria	Resolução
Cloreto	-0,0015	0,0225	0,0553	-0,2007	-0,0003
Nitrato	-0,0017	0,0264	0,0082	-0,0297	0,0001
Sulfato	-0,0019	0,0228	0,0600	-0,0412	0,0002
Oxálico	-0,0013	0,0006	0,0007	-0,030	0,0007
Pirúvico	0,0005	-0,0308	-0,0621	0,0300	-0,0022
Cit. + Mal.	0,0035	0,0408	0,0389	0,0607	-0,0025
Fosfato	0,0034	-0,0402	-0,0239	0,0810	-0,0082
Láctico	0,0022	-0,0292	-0,0264	0,1040	-0,0052
Succínico	0,0044	-0,1067	-0,0700	0,0635	-0,0141
Potássio	0,0278	0,0038	0,0040	-0,0825	-0,0036
Sódio	0,0504	0,0224	0,0129	-0,0100	-0,0008
Cálcio	0,0511	-0,0050	-0,0015	-0,0197	-0,0010
Magnésio	0,0647	0,0774	0,0237	0,0487	-0,0026

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Na Tabela 24, foi possível observar que a variação do pH foi o parâmetro que resultou em maior influência na robustez do método, sendo que as respostas que mais sofreram alterações foram os resultados para os tempos de migração do ácido succínico, potássio, sódio, cálcio e magnésio; as áreas do nitrato, potássio, sódio, cálcio e magnésio, e dos ácidos cítrico,

málico e succínico; as concentrações do sulfato, potássio, sódio, cálcio e magnésio, e dos ácidos pirúvico, citrato e málico; e a simetria do cloreto e dos ácidos pirúvico, citrato, málico e lático.

O fato de a alteração do pH ter influenciado em diferentes respostas, é devido a notável influência no comportamento dos analitos no método de separação, uma vez que este influencia na protonação e/ou desprotonação dos analitos, o que pode ter contribuído para as variações das áreas e concentrações analitos. O pH também influencia na magnitude do fluxo eletrosmótico e conseqüentemente no tempo de separação dos analitos, e na dispersão por eletromigração (EMD) dos picos, resultando na alteração da simetria dos mesmos (TAVARES, 1995, 1997).

Apesar da robustez tratar-se de um estudo que possibilita ordenar e identificar a influência das variações nas respostas finais, a sua realização no procedimento de validação analítica é opcional, sendo assim, limites máximos aceitáveis para classificar se o método é robusto ou não, não são estabelecidos pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), órgão que recomenda o uso do teste de *Youden*. Contudo, 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, todas as respostas apresentaram alguma influência a partir da modificação dos parâmetros avaliados, contudo, a maior variação das respostas observada foi -0,9973, sendo este valor considerado pouco significativo, confirmando assim, a robustez do método proposto nas condições avaliadas.

5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após ser validado, o método proposto foi aplicado na determinação simultânea de minerais e ácidos orgânicos em cinco amostras de cervejas do tipo *Pilsen* nacionais. Os resultados obtidos na quantificação são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Resultados para quantificação de minerais e ácidos orgânicos em cervejas do tipo Pilsen de fabricação nacional.

Analitos	Concentração das amostras (mg L ⁻¹)				
	1	2	3	4	5
Cloreto	93,93 ± 0,63	106,42 ± 2,37	194,02 ± 1,05	112,97 ± 1,32	158 ± 1,30
Nitrato	9,1 ± 0,95	8,62 ± 1,66	17,77 ± 0,91	9,17 ± 0,63	12,02 ± 0,40
Sulfato	29,06 ± 2,91	15,05 ± 3,02	84,44 ± 2,27	16,47 ± 4,49	70,074 ± 1,60
Oxálico	nd	nd	nd	nd	nd
Pirúvico	222,34 ± 1,97	195,12 ± 1,26	231,49 ± 1,77	135,59 ± 1,32	221,78 ± 0,54
Cit. + Mal.	139,61 ± 1,99	159,18 ± 1,06	288,79 ± 1,63	226,59 ± 2,1	274,62 ± 1,07
Lático	44,74 ± 1,69	122,32 ± 4,05	94,61 ± 1,13	333,83 ± 2,03	72,66 ± 1,64
Succínico	70,71 ± 1,94	62,81 ± 1,39	86,32 ± 0,73	86,58 ± 0,9	80,39 ± 0,95
Fosfato	371,79 ± 0,15	443,15 ± 0,62	591,95 ± 0,08	463,76 ± 0,28	614,94 ± 0,33
Potássio	300,24 ± 0,31	337,49 ± 0,86	632,83 ± 0,29	454,77 ± 0,2	568,39 ± 0,37
Sódio	24,51 ± 0,45	30,19 ± 0,88	34,45 ± 0,78	37,06 ± 0,35	23,01 ± 0,23
Cálcio	30,24 ± 0,73	36,44 ± 1,19	73,08 ± 0,27	31,06 ± 0,62	57,68 ± 0,39
Magnésio	65,06 ± 0,24	68,73 ± 0,30	120,66 ± 0,14	93,97 ± 0,24	97,13 ± 0,35

Fonte: Elaborado pelo autor deste trabalho (2020).

Notas: Resultados expressos como média (mg L⁻¹) ± desvio padrão relativo. n=3.

Notas específicas: nd = não detectado. Amostras puro malte = 3, 4 e 5.

Em nenhuma das cinco amostras avaliadas, foi detectado o ácido oxálico. No estudo de Cortacero-Ramírez et al., (2005) em que foram avaliados ácidos orgânicos de baixa massa molar em diferentes tipos de cerveja, o ácido oxálico também não foi detectado em nenhuma das amostras. Pérez-Ruiz et al., (2004) determinaram ácido oxálico em quatro amostras de cervejas, e os resultados mostraram que as concentrações encontradas variaram de 12 a 25 mg L⁻¹. Siener et al., (2017) também avaliaram o teor de ácido oxálico em diferentes bebidas, e nas amostras de cervejas as concentrações apresentaram-se em torno de 1,3 a 1,78 mg L⁻¹. As concentrações dos AOA em cervejas estão diretamente relacionadas às matérias-primas utilizadas e ao tipo de fermentação empregado, sendo que, a ausência do ácido oxálico nas amostras pode ser explicada pelo estilo das cervejas analisadas, no qual as cervejas do estilo *Pilsen* são pertencentes à família *Lager*, que caracterizam-se por fermentação com temperaturas mais baixas (entre 6 e 16 °C), sendo que o metabolismo da levedura é mais brando em relação as cervejas da família *Ale*, as quais acontecem em temperaturas mais elevadas, e com isso, são produzidos aromas e sabores diferenciados, provenientes dos metabólitos produzidos pela levedura, entre os quais, diferentes ácidos orgânicos (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Além disso, estudos já demonstraram que o mosto contém pequenas concentrações de ácido oxálico, contudo, este ácido possui uma forte afinidade pelos íons cálcio e forma rapidamente precipitados cristalinos de oxalato de cálcio, que são insolúveis (HORNSEY, 2016; LEWIS; YOUNG, 2001), sendo outro motivo para explicar a ausência deste ácido nas amostras analisadas.

Todos os outros AOA foram detectados nas amostras em diferentes concentrações. Para o ácido pirúvico, a concentração variou de 135,59 a 231,49 mg L⁻¹, para os ácidos cit. + mal., de 139, 61 a 288,79 mg L⁻¹, para o ácido láctico, de 44,74 a 333,83 mg L⁻¹ e para o ácido succínico de 62,81 a 86,58 mg L⁻¹. A maior concentração de AOA foi 333,83 mg L⁻¹ para o ácido láctico. Klampfl (1999) avaliou ácidos orgânicos em diferentes tipos de cerveja e as concentrações de ácido láctico variaram de 351 a 556 mg L⁻¹. No estudo de Rodrigues et al., (2010) as concentrações de ácido cítrico, málico, succínico e pirúvico ficaram muito próxima das encontradas neste trabalho.

Ainda, é interessante ressaltar que, de modo geral, as amostras 3, 4 e 5, que eram cervejas puro malte, apresentaram as maiores concentrações de AOA, em comparação com as amostras 1 e 2, que continham na composição cereais não malteados, reforçando o fato de que as diferenças de composição das matérias-primas utilizadas e as etapas de produção afetam notavelmente as concentrações e variação dos compostos encontrados em cervejas. Em estudo

realizado por Kozaki et al., (2019), que avaliou a concentração de AOA em cervejas filtradas e não filtradas, as cervejas não filtradas apresentaram as maiores concentrações dos ácidos pirúvico, cítrico, málico e succínico, em relação às cervejas filtradas.

Em relação aos minerais, todos foram encontrados nas cinco amostras analisadas neste estudo, o íon nitrato, que tem relação com formação de nitrosaminas, apresentou concentrações que variaram de 8,62 a 17,77 mg L⁻¹, valores próximos dos encontrados por Della Betta et al., (2019), onde o íon nitrato variou de 0,41 a 54,1 mg L⁻¹. Além da água que pode ser fonte de nitrato, ingredientes como malte, adjuntos e o lúpulo podem contribuir para a maior concentração de nitrato na bebida (BUGLASS, 2011).

Todos os outros minerais variaram bastante em suas concentrações, o que pode ser explicado principalmente pela diferença nas matérias-primas utilizadas, sendo o malte e a água os principais contribuintes de minerais na cerveja.

Como observado nos AOA, os teores de minerais presentes nas amostras 3, 4 e 5, que eram cervejas puro malte, foram maiores em comparação com as amostras 1 e 2, que continham na composição cereais não malteados, com destaque para o íon potássio, que variou de 300,24 (amostra 1) a 632,83 mg L⁻¹ (amostra 3).

No estudo de Shala et al., (2013) que avaliou a influência de minerais, nitrogênio, fósforo e potássio durante o cultivo de algumas variedades de cevada de inverno a produção de cerveja, foi verificado que as variedades de cevada que obtiveram os maiores rendimentos foram plantadas no solo onde continha a maior concentração de potássio. Kozaki et al., (2019) avaliaram a relação da concentração de potássio com o malte utilizado na produção de cerveja, e verificaram que as cervejas puro malte continham as maiores concentração de malte, seguido pelas cervejas puro malte de outras espécies, sem ser a cevada, e por último, com as menores concentrações, as cervejas com adjuntos, como arroz, milho e amido. Com isso, o íon potássio pode servir como possível indicador da qualidade, quantidade e tipo de malte e demais cereais utilizados na produção cervejeira.

6 CONCLUSÕES

Através da realização desse trabalho foi possível concluir que o *software PeakMaster*[®] foi uma ferramenta essencial que auxiliou no desenvolvimento do método por CZE. Ainda que não fosse possível prever o comportamento da adição de solvente orgânico pelo *software* de simulação, foi possível elucidar parâmetros de separação e indicar variáveis que seriam mais tarde utilizadas na construção do planejamento fatorial. Além de minimizar o uso de reagentes e padrões em demasia, minimizando a geração de resíduos.

O planejamento fatorial foi uma ótima ferramenta a fim conduzir experimentos multivariados durante o desenvolvimento do método, minimizando o empirismo que envolvem tentativa e erro, conseqüentemente, minimizando o número de experimentos muitas vezes desnecessários e viabilizando o reconhecimento de uma condição adequada a ser trabalhada dentro das variáveis estudadas.

Apesar do método proposto não permitir a separação dos ácidos cítrico e málico, este demonstrou eficiência na separação simultânea de 14 analitos com caráter aniônico e catiônico na mesma corrida, sem a necessidade de dois métodos independentes e dispensando dois preparos de amostra.

Quando validado, o método apresentou de uma forma geral resultados satisfatórios para os parâmetros estudados e capacidade de gerar resultados analíticos confiáveis para a determinação dos íons estudados em amostras de cervejas nacionais.

Nenhuma das amostras estilo Pilsen avaliadas apresentou o ácido oxálico em sua composição, entretanto, a concentração dos outros analitos variaram de forma significativa, o que pode estar relacionado às diferentes matérias-primas utilizadas na produção da cerveja, por exemplo, diferentes cultivares de cevada, diferentes cereais não malteados, lúpulo e cepas de levedura.

A concentração mineral das cervejas puro malte foram bem maiores que as cervejas com cereais não malteados na formulação, o que pode estar relacionado à composição do malte de cevada, principalmente na diferença de concentração do potássio, sendo um possível indicador de qualidade na avaliação de cervejas puro malte.

7 PERSPECTIVAS

Ampliar o estudo do planejamento fatorial a fim de identificar uma composição de BGE com capacidade para separar os ácidos cítrico e málico;

Identificar outro padrão interno, com menor EMD e que contemple os analitos que ficaram mais distantes do padrão interno atual;

Realizar estudo de seletividade do método com auxílio de outra técnica analítica com outro princípio de separação ou a partir de outro método de separação por eletroforese capilar, com mecanismo diferenciado;

Ampliar a aplicabilidade do método proposto, além de avaliar o efeito de matriz e aplicar o método proposto para diferentes estilos de cervejas artesanais a fim de identificar a diferença nas concentrações dos analitos de interesse relacionados ao estilo correspondente;

Avaliar também, através de parcerias com as cervejarias do Estado de Santa Catarina, as concentrações dos analitos de interesse nas matérias-primas utilizadas para a fabricação de um ou mais estilos diferentes, bem como acompanhar durante todo o processo cervejeiro como se comportam essas concentrações, para avaliar a evolução dos analitos de interesse durante o processo de fabricação até o armazenamento e consumo.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, H. E. *et al.* A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. **Analytica Chimica Acta**, v. 1085, p. 1–20, 28 nov. 2019.
- 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.
- BAMFORTH, C. W. Beer styles and recipe development: what should I brew? In: **The Craft Brewing Handbook**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 47–63.
- BARRA, P. M. C. *et al.* Study of fatty acids profile in biological sample by capillary zone electrophoresis associate to chemometric approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 675–685, 2014.
- BETTENHAUSEN, H. M. *et al.* Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, n. March, p. 487–504, 2018.
- BOGDAN, P.; KORDIALIK-BOGACKA, E. **Alternatives to malt in brewing** *Trends in Food Science and Technology*, 2017.
- BOSSERHOFF, A. K.; HELLERBRAND, C. **Capillary Electrophoresis**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.**, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL**, 2018a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018: Crescimento e Inovação**, 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 65, de 10 de dezembro de 2019. **Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria.**, 2019.

BRIGGS, D. E. *et al.* **Brewing: Science and Practice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

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.

BUGLASS, A. J. **Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects**. II ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2011.

BUIATTI, S. Beer Composition: An Overview. In: PREEDY, V. R. (Ed.). . **Beer in Health and Disease Prevention**. Cambridge: Academic Press, 2009. p. 213–225.

CERVBRASIL. Dados do setor. 2020. Disponível em:

<http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/> Acesso em: 20 de jun. de 2020.

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.

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

CORTACERO-RAMÍREZ, S. *et al.* Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, n. 1, p. 115–119, 2005.

CORTESE, M. *et al.* Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2019.

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.

DAS, A. J. *et al.* HPLC and GC-MS analyses of organic acids, carbohydrates, amino acids and volatile aromatic compounds in some varieties of rice beer from northeast India. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 3, p. 244–252, 1 jun. 2014.

DAŞBAŞI, T. *et al.* A new synthesis, characterization and application chelating resin for determination of some trace metals in honey samples by FAAS. **Food Chemistry**, v. 203, p. 283–291, 2016.

DE SENA AQUINO, A. C. M. *et al.* Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, v. 172, p. 725–730, 2014.

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**, p. 161, 2016.

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. *et al.* Assessment of nitrate, nitrite, bromate and bromide levels in beer from different styles and origins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 79, p. 63–69, 1 jun. 2019.

DOLZAN, M. D. *et al.* A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 6023–6029, 2013.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression. I. **Biometrika**, v. 37, n. 3–4, p. 409–428, 1 dez. 1950.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Hop Chemistry. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019.

EL-ZOMRAWY, A. A. Selective and sensitive spectrophotometric method to determine trace amounts of copper metal ions using Amaranth food dye. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 203, p. 450–454, 2018.

ELBASHIR, A. A. *et al.* Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ofloxacin in tablets. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 31, n. 18, p. 2771–2783, 2008.

EURACHEM. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. **Eurachem**, p. 1–70, 2014.

FISCHER, J.; JANDERA, P. General Aspects of Instrumentation. In: UTE PYELL (Ed.). . **Electrokinetic Chromatography : Theory, Instrumentation and Applications**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p. 235–262.

FOULON, C.; DI GIULIO, P.; LECOEUR, M. Simultaneous determination of inorganic anions and cations by supercritical fluid chromatography using evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1534, p. 139–149, 2017.

GAŠ, B. *et al.* PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. **Lc Gc Europe**, v. 18, n. 5, p. 282–288, 2005.

GRUBBS, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1, fev. 1969.

GUO, C.; GUO, Z.; CHEN, Y. A bi-end injection capillary electrophoresis method for simultaneous determination of 37 cations and anions in beers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 18, p. 4113–4121, 2019.

HARRISON, M. A. Beer / Brewing. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). . **Encyclopedia of Microbiology**. [s.l.] Academic Press, 2009. p. 23–33.

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Beer/Brewing. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017.

HE, L. *et al.* Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 109–114, 2017.

HEIGER, D. High performance capillary electrophoresis. **Agilent Technologies**, n. 1, p.

e16148, 7 jan. 2000.

HELLER, M. *et al.* A rapid sample screening method for authenticity control of whiskey using capillary electrophoresis with online preconcentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6882–6888, 2011.

HORNSEY, I. S. Beer: History and Types. In: BENJAMIN CABALLERO; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.). . **Encyclopedia of Food and Health**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 345–354.

INMETRO. (Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, v. 5, p. 31, 2016.

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.

JONES, L.; BREADMORE, M. C. **Separation of Small-Mass Ions**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

JOUYBAN, A.; KENNDLER, E. Capillary Electrophoresis with Organic Solvents in Pharmaceutical Analysis: A Systematic Guide through the Background. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 248–266, 11 mar. 2014.

KARLINSEY, J. M. Electrophoresis. In: YOLANDA PICÓ (Ed.). . **Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 375–405.

KLAMPFL, C. W. Analysis of Organic Acids and Inorganic Anions in Different Types of Beer Using Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 987–990, 1999.

KLAMPFL, C. W. *et al.* Determination of purines and pyrimidines in beer samples by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 454, n. 2, p. 185–191, 2002.

KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U. Determination of low-molecular-mass anionic compounds in beverage samples using capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect ultraviolet and conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 822, n. 1, p. 117–123, 1998.

KOZAKI, D. *et al.* Single injection ion-exclusion/cation-exchange chromatography for simultaneous determination of organic/inorganic anions, inorganic cations, and ethanol in beer samples. **Food Chemistry**, v. 274, p. 679–685, 2019.

LAŠTOVIČKOVÁ, M.; BOBÁLOVÁ, J. **MS based proteomic approaches for analysis of barley malt** *Journal of Cereal Science*, 2012.

LELOVA, Z. *et al.* Optimization and Validation of a New Capillary Electrophoresis Method with Conductivity Detection for Determination of Small Anions in Red Wines. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1457–1466, 2018.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; Hoeffding, W.; MADOW, W.G.; MANN, H. (Ed.). . **Contributions to probability and statistics**. Stanford: Stanford University Press: [s.n.]. p. 278–292.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. Boston, MA: Springer US, 2001.

LI, H.; LIU, F. Changes in organic acids during beer fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 3, p. 275–279, 2015.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2017a. p. 305–351.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry**. [s.l.] Elsevier, 2017b. p. 305–351.

LIVENS, S. Beer: Fermentation. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 339–344.

LUO, T. *et al.* Determination of underivatized amino acids to evaluate quality of beer by capillary electrophoresis with online sweeping technique. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 4, p. 789–797, 2017.

MAI, T. D. *et al.* Triple-channel portable capillary electrophoresis instrument with individual background electrolytes for the concurrent separations of anionic and cationic species. **Analytica Chimica Acta**, v. 911, p. 121–128, 2016.

MARQUES, T. L.; NÓBREGA, J. A. Fast and simple flow-batch extraction procedure for screening of macro and micronutrients in dried plant leaves by ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 27–34, 2017.

MAZINA, J.; GORBATSOVA, J. Sample preparation for CE-DAD analysis of the water soluble vitamins in food products. **Procedia Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 46–53, 2010.

MEYER, S. *et al.* Development, validation and application of an ICP-MS/MS method to quantify minerals and (ultra-)trace elements in human serum. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 49, n. February, p. 157–163, 2018.

MONTANARI, L. *et al.* Minerals in Beer. In: **Beer in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 359–365.

MOUNTENEY, I. *et al.* Heavy mineral analysis by ICP-AES a tool to aid sediment provenancing. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 184, n. October 2017, p. 1–10, 2018.

PALMER, J.; KAMINSKI, C. **Water: A comprehensive Guide for Brewers**. [s.l.] Brewers Publications, 2013.

PARKER, D. K. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. In: **Alcoholic Beverages**. Campden BRI: Woodhead Publishing Limited, 2012. p. 133–158.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1–2, p. 57–64, 13 fev. 2004.

POHL, P. Metals in Beer. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 349–358, 2009.

RENNEBERG, R.; BERKLING, V.; LOROCH, V. Beer, Bread, and Cheese. In: **Biotechnology for Beginners**. 2^a ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 1–31.

RIZELIO, V. M. *et al.* Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 93, p. 62–66, 2012a.

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, 2012b.

RODRIGUES, J. E. A. *et al.* Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 166–175, 2010.

SÁIZ, J. *et al.* Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 162–172, nov. 2014.

SHALA, N. *et al.* **Control of the influence of minerals, nitrogen, phosphorus and potassium during cultivation of some varieties of winter barley (hordeum vulgare l.) for beer production.** IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline). **Anais...2013**

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591, dez. 1965.

SIENER, R. *et al.* Oxalate content of beverages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 184–188, 2017.

SOGA, T.; ROSS, G. A. Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: Effect of electrolyte's complexing ability. **Journal of Chromatography A**, v. 767, n. 1–2, p. 223–230, 1997.

SOO LIM, H. *et al.* Development and validation of HPLC method for the determination of ferrocyanide ion in food grade salts. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1167–1174, 2018.

STEWART, G. G. **Beer: Raw Materials and Wort Production**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

SZILÁGYI, T. G. *et al.* Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 256, n. October 2017, p. 129–132, 2018.

TALLINI, L. R. *et al.* Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 3, p. 219–227, 2015.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Quimica Nova**, 1995.

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

THOMAS, O.; ROIG, B. Mineral constituents. In: THOMAS, O.; BURGESS, C. (Eds.). . **UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater**. [s.l.] Elsevier Science, 2017. p. 163–200.

TOKPOHOZIN, S. E.; FISCHER, S.; BECKER, T. Selection of a new *Saccharomyces* yeast to enhance relevant sorghum beer aroma components, higher alcohols and esters. **Food Microbiology**, 2019.

VANDERHAEGEN, B. *et al.* The chemistry of beer aging - A critical review. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 357–381, 2006.

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.

VOGEL, A. **Química Analítica Qualitativa**. Mestre Jou ed. São Paulo: [s.n.].

WANG, M. *et al.* Determination of total selenium in food samples by d-CPE and HG-AFS. **Food Chemistry**, v. 227, p. 329–334, 2017.

WANG, X. *et al.* Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 278–287, 2018.

WARD, M. H.; BRENDER, J. D. **Drinking Water Nitrate and Health**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.

WESTON, A.; BROWN, P. R. Separations in Capillary Electrophoresis. In: **HPLC and CE**. [s.l.] Academic Press, 1997. p. 154–184.

ZARNKOW, M. Beer. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, v. 1, p. 209–215, 2014.