

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NPGQ
MESTRADO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
SUCOS DE FRUTAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR DE ZONA (ECZ)**

JOSÉ MARCOS VALENTIM DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Gebelein Gervasio

SÃO CRISTOVÃO/SE

2010

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
SUCOS DE FRUTAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR DE ZONA (ECZ)**

JOSÉ MARCOS VALENTIM DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Sergipe como um dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Gebelein Gervasio

SÃO CRISTOVÃO/SE

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C331d Carvalho, José Marcos Valentim de
Desenvolvimento de um método para determinação de ácidos orgânicos em sucos de frutas utilizando eletroforese capilar de zona (ecz) / José Marcos Valentim de Carvalho. – São Cristóvão, 2010.
107 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof. Dra. Ana Paula Gebelein Gervasio

1. Ácidos orgânicos. 2. Sucos – Produtos industrializados. 3. Eletroforese capilar de zona. I. Título.

CDU543.2:635.077

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, pelo dom da vida;
- ❖ A professora Ana Paula pela orientação, pelo aprendizado, pela perseverança e companheirismo. Você foi essencial nessa conquista;
- ❖ Aos meus pais por estarem sempre presentes e terem me dado muita força em todos os momentos;
- ❖ A Neneta, Lucia, Valdirene, Naiane, Junior e Edu, que mesmo sem perceber me deram coragem para continuar em frente, buscando sempre o melhor caminho;
- ❖ Aos professores Sandro e Péricles pelas observações pertinentes no exame de qualificação;
- ❖ A todos os professores que contribuíram na minha formação;
- ❖ A my teacher (Evicelma Vieira), pelo companheirismo e ajuda na tradução dos artigos;
- ❖ A Moisés Menezes e Angélica, pelo companheirismo e dedicação;
- ❖ A minha “irmã” Aparecida Fontes, e a Eli pela força e carinho;
- ❖ A todos os meus amigos do Campus de São Cristóvão, e do Campus de Itabaiana (Roberta, Geisiane, Leidiane) que sempre estiveram dispostos a me ajudar;
- ❖ Aos meus amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram muito na concretização desse trabalho (Thiago, Marcinha, Rogério, e amigos de trabalho).

Sem vocês teria sido muito difícil a concretização dessa conquista

Muito obrigado

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. JUSTIFICATIVA	5
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
4.1. ÁCIDOS ORGÂNICOS (OXÁLICO, TARTÁRICO, CÍTRICO, GÁLICO e o L – aa) EM AMOSTRAS DE SUCOS DE FRUTAS	8
4.2. ASPECTOS GERAIS DA ELETROFORESE CAPILAR	11
4.2.1. TIPOS DE ELETROFORESE CAPILAR	11
4.2.2. INSTRUMENTAÇÃO	13
4.2.3. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA	14
4.2.4. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA	15
4.2.5. SOLUÇÃO TAMPÃO	17
4.2.6. ADITIVOS	18
4.2.7. DETECTORES	18
4.2.8. CAPILARES	20
4.2.9. AGENTES MODIFICADORES DA SUPERFÍCIE CAPILAR	20
4.2.10. FLUXO ELETROOSMÓTICO (FEO)	21
4.2.11. INVERSÃO DO FLUXO ELETROOSMÓTICO	22

4.3. ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA CE	24
4.3.1. MOBILIDADE IÔNICA	24
4.3.2. EFEITO DOS PARÂMETROS ELETROFORÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO	25
4.3.2.1. TEMPO DE MIGRAÇÃO	25
4.3.2.2. RESOLUÇÃO E EFICIÊNCIA	27
4.3.3. TEMPERATURA	28
4.3.4. FLUXO ELETROOSMÓTICO	29
4.3.5. VOLUME INJETADO DA AMOSTRA E COMPRIMENTO DE ZONA	30
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	51
6.1. MATERIAIS E MÉTODOS	51
6.2. SOLUÇÕES E REAGENTES	52
6.3. ESTUDO DAS AMOSTRAS	53
6.3.1. AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	53
6.3.2. PREPARAÇÃO, DILUIÇÃO, TEMPO, TEMPERATURA DE ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS E NÚMERO DE ANÁLISE	53
6.4. CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS	55
6.4.1. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA	55
6.4.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO	56
6.4.3. INFLUÊNCIA DO pH DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO NO PERFIL DO PICO	56
6.4.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INJEÇÃO SOBRE O PERFIL DO PICO	57
6.4.5. USO DE METANOL NA SOLUÇÃO DE SEPARAÇÃO	57
6.4.6. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS ESTUDADOS	57
6.4.7. CURVAS ANALÍTICAS DOS ÁCIDOS ESTUDADOS E CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO PROPOSTO	58
6.4.8. VALIDAÇÃO	58

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
7.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO	61
7.2. INFLUÊNCIA DO pH DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO NO PERFIL DOS PICOS	63
7.3. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INJEÇÃO SOBRE O PERFIL DO PICO	66
7.4. USO DE METANOL NA SOLUÇÃO DE SEPARAÇÃO	67
7.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	69
7.6. CURVAS ANALÍTICAS	71
7.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO	76
7.7.1. TEMPO DE ESTUDO E CONCENTRAÇÕES OBTIDAS	76
7.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	87
7.8.1. LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO	87
7.8.2. SENSIBILIDADE	88
7.8.3. PRECISÃO	88
7.8.4. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO	89
7.8.5. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)	91
7.8.6. REPETIBILIDADE	92
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	96
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
11. ANEXOS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos ácidos orgânicos estudados: oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa.	10
Figura 2 – Sistema eletroforético caseiro.	14
Figura 3 – Sistema CE. A e B – recipientes contendo solução eletrolítica, onde se encontram os eletrodos de platina (PL), (F) – fonte de potência (V) – fonte de radiação, (D) – detector acoplado a um computador – (C), (EF) – fluxo eletroforético, (EOF) – fluxo eletroosmótico, (E) – eletroferograma. Os círculos brancos representam os íons, os sinais negativos e positivos indicam as cargas.	15
Figura 4 – Diagrama do sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade: A cubo de isopor; B e C suporte de madeira; D e E frascos contendo a solução eletrolítica.	16
Figura 5 – Influência do pH da solução tampão sobre a mobilidade do fluxo eletroosmótico.	17
Figura 6 – Capilar de sílica após a remoção de poliimida.	19
Figura 7 – Formação do fluxo eletroosmótico.	21
Figura 8 – Esquema ilustrando as diferenças entre o perfil do fluxo pressurizado e o eletroosmótico.	22
Figura 9 – Representação esquemática da adsorção de surfactantes sobre a superfície interna de capilares de sílica fundida.	24
Figura 10 – Lei de Ohm. Variação da voltagem e da corrente do sistema em função do aumento da concentração da solução. Condições experimentais: H_3BO_3 pH= 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB.	61

Figura 11 – Eletroferogramas obtidos na avaliação da concentração da solução de H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB. Voltagem de 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm. A- 100 mmol/L, B- 150 mmol/L e C- 200 mmol/L. Ácido cítrico 0,3 g/100mL. 63

Figura 12 – Eletroferogramas para os ácidos orgânicos em diferentes valores de pH: A – ácido oxálico, B – ácido tartárico, C – ácido cítrico. Condições experimentais: 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm. 65

Figura 12.1 – Eletroferogramas para os ácidos orgânicos em diferentes valores de pH: D – ácido gálico, E – L – aa. Condições experimentais: 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm. 66

Figura 13 – Eletroferogramas – tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade na separação das 5 espécies estudadas. 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, $\lambda = 214$ nm. ácido oxálico (1), ácido tartárico (2), ácido cítrico (3), ácido gálico (4), L – aa (5). 67

Figura 14 – Eletroferogramas obtidos no estudo da concentração de metanol no eletrólito de separação dos ácidos orgânicos. 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB pH 10,0, 15 s de injeção (4,5 cm de altura), 8 kV, $\lambda = 214$ nm, 0,0150 g/100mL ácido oxálico (1) e L – aa (5), 0,0250 g/100mL ácido tartárico (2) e cítrico (3), 0,0100 g/100mL ácido gálico (4). 68

Figura 15 – Eletroferogramas obtidos na identificação dos picos: (1) e (5) 0,0150 g/100mL, (2) e (3) 0,0250 g/100mL, (4) 0,0060 g/100mL, (1) ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido cítrico, (4) ácido gálico, (5) L – aa – 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, 15 s de injeção hidrodinâmica, 8 kV, $\lambda = 214$ nm, A=mistura inicial, B=mistura 1, C=mistura 2, D=mistura 3, E=mistura 4, F=mistura 5. 71

Figura 16 – Curva analítica para o ácido oxálico na presença do ácido tartárico, 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm. 72

Figura 17 – Curva analítica para o ácido tartárico na presença do ácido oxálico, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm.	73
Figura 18 – Curva analítica para o ácido tartárico, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ , pH 10,0, 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção a 4,5 cm por gravidade $\lambda = 214$ nm.	73
Figura 19 – Curva analítica para o ácido cítrico, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda=214$ nm.	74
Figura 20 – Curva analítica para o ácido cítrico na presença do L – aa, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s, $\lambda = 214$ nm.	74
Figura 21 – Curva analítica para o L – aa na presença de ácido cítrico, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm.	75
Figura 22 – Curva analítica para o L – aa, 100 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s, $\lambda = 214$ nm.	75
Figura 23 – Variações das concentrações obtidas no suco fresco durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 5,62 dias; 45 dias).	78
Figura 24 – Variações das concentrações obtidas nos sucos frescos durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 6 dias; 45 dias).	78
Figura 25 – Variações das concentrações obtidas nos sucos frescos durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 6,5 dias; 33 dias).	79
Figura 26 – Variações das concentrações obtidas dos ácidos oxálico (1) e tartárico (2) avaliadas nos sucos frescos no período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 5,5 dias; 28 dias).	79
Figura 27 – Variações das concentrações obtidas nos sucos industrializados durante o período do estudo. A = misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = misto de laranja, limão e tangerina D = goiaba, E = misto de maçã, limão e uva, (Escala: 0-1 equivale a 16 dias, 56 dias).	82

Figura 28 – Variações das concentrações nos sucos industrializados durante o período do estudo. A = misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = misto de maçã, laranja, tangerina e limão. (Escala: 0-1 equivale a 16 dias, 56 dias). 82

Figura 29 – Eletroferogramas dos ácidos orgânicos na amostras dos sucos frescos: A – de uva, B – morango, C – caju, D – acerola, E – carambola, F – de limão, G – umbu-cajá, H – laranja; (1) ácido oxálico (2) ácido tartárico (3) ácido cítrico (5) L – aa. 83

Figura 30 – Eletroferogramas dos ácidos orgânicos na amostras dos sucos industrializados. A = Suco misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = suco misto de laranja, limão e tangerina D = suco de goiaba, E = suco misto de maçã, limão e uva (3) ácido cítrico (5) L – aa. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mobilidade eletroforética e número de grupamentos ácidos (NG) e de átomos (NA) dos ácidos estudados.	10
Tabela 2 – Aditivos de eletrólitos comumente empregados em eletroforese capilar. FONTE: TAVARES M FM, 1997.	107
Tabela 3 – Estudos para a determinação dos principais ácidos orgânicos em sucos de frutas e gêneros alimentícios utilizando eletroforese capilar de zona BGE – Eletrólito de separação.	48
Tabela 4 – Estudos para a determinação dos principais ácidos orgânicos em sucos de frutas e gêneros alimentícios utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.	50
Tabela 5 – Diluição, condições e tempo de armazenamento das amostras de sucos de frutas frescos.	54
Tabela 6 – Diluição, condições e tempo de armazenamento das amostras de sucos industrializados.	54
Tabela 7 – Identificação dos picos dos ácidos, oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa.	70
Tabela 8 – Resultados das concentrações dos ácidos orgânicos (g/100mL) dos sucos de frutas frescos durante o período do estudo.	77
Tabela 9 – Resultados das concentrações (g/100mL) dos ácidos orgânicos nos sucos industrializados durante o período do estudo.	81
Tabela 10 – Médias dos resultados dos ácidos orgânicos (g/100mL) nas amostras dos sucos frescos.	85
Tabela 11 – Médias dos resultados dos ácidos orgânicos (g/100mL) nas amostras dos sucos industrializados.	86

Tabela 12 – Comparando os resultados dos ácidos orgânicos deste trabalho com outros. Dados: ácidos 1-oxálico, 2-tartárico, 3-cítrico, 5-L – aa.	86
Tabela 13 – Linearidade para os ácidos oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa, na faixa de concentração de 0,0040 a 0,0450.	87
Tabela 14 – Faixa de trabalho dos ácidos orgânicos.	88
Tabela 15 – Coeficientes de variação (CV) para os ácidos orgânicos nos níveis de concentração de 0,0100, 0,0150 e 0,0200 g/100mL.	89
Tabela 16 – Recuperação dos ácidos orgânicos (g/100mL) nos sucos de frutas frescos.	90
Tabela 17 – Recuperação dos ácidos orgânicos (g/100mL) nos sucos de frutas industrializados.	91
Tabela 18 – Limite de Detecção e Quantificação (g/100mL), para os ácidos orgânicos estudados.	92
Tabela 19 – Concentrações obtidas para o ácido cítrico e o L – aa no limão e na laranja no mesmo dia e entre-dias.	93

LISTA DE ABREVIATURAS

CE – Capillary Electrophoresis (CE – Eletroforese Capilar)

CZE – Capillary Zone Electrophoresis (ECZ – Eletroforese Capilar de Zona)

FSCE – Free-solution Capillary Electrophoresis (ECSL – Eletroforese Capilar em Solução Livre)

MECC – Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (ECM – Eletrocromatografia Micelar)

MEKC – Micellar Electrokinetic Chromatography (CECM – Cromatografia Eletrocínética Micelar)

CGE – Capillary Gel Electrophoresis (ECG – Eletroforese Capilar em Gel)

CIEF – Capillary Isoelectric Focusing (FIC – Focalização Isoelétrica Capilar)

CITP – Capillary Isotachopheresis (IC – Isotacoforese Capilar)

HPLC – High-performance Liquid Chromatography (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

GC – Gas Chromatography (CG – Cromatografia gasosa)

DNP – 2,4-dinitrophenylhydrazine (DFH – 2,4-dinitrofenilhidrazina)

CTAB – Cetyltrimethylammonium Bromide (BCTA – Brometo de Cetiltrimetilamônio)

TTAB – Tetradecyltrimethylammonium Bromide (BTTA – Brometo de tetradeciltrimetilamônio)

TTAOH – Tetradecyltrimethylammonium Hydroxide (HOTTA – Hidróxido de Tetradeciltrimetilamônio)

TMA – Trimethylic Acid (ATM – Ácido Trimetílico)

TMA – 1,2,4,5-Tetracarboxylicbenzoic Acid (ATA – Ácido 1,2,4,5-tetracarboxílicobenzoico)

BTA – 1,3,5-benzenetricarboxylic acid (Ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico – ABT)

TEPA – Tetraethylenepentamine (TEPA – Tetraetilenopentamino)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (AEDT – Ácido Etilenodiaminotetraacético)

PDC – 2,6-Pyridinedicarboxylic Acid (APC – Ácido 2,6-piridinocarboxílico)

MTAB – Myristyltrimethylammonium Bromide (BMTA – Brometo de Miristiltrimetilamônio)

DNB – 3,5-Dinitrobenzoic (DNB – 3,5-Dinitrobenzóico)

GARP – Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes

CMC – Critical Micellar Concentration (CMC – Concentração Micelar Crítica)

d.i. – Diâmetro interno

d.e. – Diâmetro externo

L-aa – L-ascorbic acid (L-aa – L-ácido ascórbico)

UV/Vis – Ultravioleta/visível

CV – Coeficiente de variação

RSD – Relative Standard Deviation (DPR – Desvio Padrão Relativo)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

RESUMO

Uma metodologia eletroforética com detecção no UV foi desenvolvida para determinação dos ácidos orgânicos contidos em sucos de frutas frescos e em sucos de frutas industrializados produzidos em Sergipe/Brasil e comercializados nos mercados e supermercados de Lagarto, Itabaiana e Aracaju. Os ácidos orgânicos: oxálico, tartárico, cítrico e o ácido ascórbico (L – aa) foram separados e quantificados em amostras de sucos frescos de uva, laranja, limão, carambola, umbu-cajá, acerola, caju, morango e em amostras de sucos industrializados (misto de acerola, laranja fortificado com L – aa; misto de maçã, laranja, tangerina e limão; misto de laranja, limão e tangerina; suco de goiaba e misto de maçã, limão e uva). As análises foram realizadas empregando uma solução tampão contendo 100 mmol/L de tampão borato pH 10,0 e 0,5 mmol/L de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como inversor do fluxo eletroosmótico, um capilar de sílica fundida de 59 cm de comprimento (23,7cm efetivo, 75 μ m de d.i.) e detecção a $\lambda=214$ nm. A injeção da amostra foi feita no modo hidrodinâmico (altura de 4,5 cm) por 15 s. O método mostrou-se linear numa faixa de 0,0040 a 0,0450 g/100 mL, as curvas de calibração foram preparadas com adição de padrão externo, com coeficiente de correlação de 0,9912 a 0,9995, a precisão variou de 1,48 a 11,46% (n = 3), o limite de detecção variou de 0,0005 - 0,0155 g/100mL e o de quantificação 0,0016 - 0,0517 g/100 mL. As recuperações dos ácidos nas amostras de sucos frescos variaram de 83,60 a 117,5% (n = 50), e de 83,60 a 108,7% (n=11) para os ácidos nas amostras de sucos industrializados. Os ácidos, oxálico, tartárico, cítrico e L – aa foram separados e quantificados nas amostras de sucos frescos, enquanto que os ácidos, cítrico e L – aa, nas amostras de sucos industrializados, sendo que houve redução na concentração do ácido ascórbico de 18,90%, 28,20% e 36,00% nos sucos frescos de acerola, laranja e caju respectivamente, e de 100,0% no suco industrializado misto de maçã, laranja, tangerina, limão e 99,40% no suco industrializado misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, houve também redução na concentração do ácido cítrico em duas amostras de sucos industrializados, 15,20% e 56,90% nos sucos, misto de maçã, laranja, tangerina, limão, e no de goiaba. O método desenvolvido foi rápido, sensível e adequado para análise de ácidos orgânicos em amostras de sucos de frutas.

Palavras chaves: ácidos orgânicos, sucos de frutas frescos, sucos de frutas industrializados, ECZ.

ABSTRACT

An electrophoretic methodology with UV detection was developed for determinations the main organic acids contained in fresh fruit juice and industrialized fruits juices produced in Sergipe/Brazil and sold in markets and supermarkets of Lagarto, Itabaiana and Aracaju. Oxalic, tartaric, citric, gallic and ascorbic (L – aa) organic acids were separate and quantified in grape, orange, lemon, carambola, umbu-caja, acerola, cashew, strawberry samples of fresh juices and samples of mixed juice industrialized (mixed acerola, orange, fortified whit L – aa; mixed apple, orange, tangerine and lemon; mixed orange, lemon and tangerine; guava juice and mixed apple, lemon and grape). The analyses were made employing BGE containing 100 mmol/L borate buffer pH 10.0 and 0.5 mmol/L cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) as EOF-modifier, a fused silica capillary of 59 cm of length (23.7 cm effective, 75 mm of i.d.) $\lambda = 214$ nm. The sample injection was made in hydrodynamic mode (height 4.5 cm) for 15 s, the method was linear within 0.0040 to 0.0450 g/100mL. The calibration curves were prepared with the addition of external standard, with correlation coefficient from 0.9912 to 0.9995, the precision ranged of 1.48 to 11.46% (n= 3). The limit of detection varied from 0.0005 to 0.0155 g/100mL and the limit of quantification varied from 0.0016 to 0.0517 g/100mL. The recoveries in samples of fresh juices were 83.6 to 117.5% (n = 50) and from 83.60 to 108.7% (n=11) for the acids in fruits juices industrialized samples. The oxalic, tartaric, citric, and L – aa were separated and quantified in samples of fresh juices while citric and L – aa acid in samples of industrialized juices there was reduction in the concentration of 18.90%, 28.20% and 36.00% L - aa of juices of fresh acerola, orange and cashew respectively and of 100.0%, 99.40% in samples of mixed juice industrialized, mixed apple, orange, tangerine and lemon, mixed acerola, orange, fortified whit L – aa respectively, was also reduction the concentration of citric acid in two samples juice industrialized 15,20% in mixed apple juice, orange, tangerine, lemon and 56,9% in guava juice. The proposed method is rapid and sensitive and can be used to analysis of organic acids in juice fruit samples.

Key words: Organic acids, fresh fruit juice, industrialized fruit juice, CZE.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial no século 18, especificamente no ano de 1729, acabou destacando a necessidade das indústrias proporem métodos analíticos que apresentassem resultados rápidos e satisfatórios. Isso estimulou o desenvolvimento novos métodos analíticos, dentre eles, a titulação. Em meados do século 20, diante da grande necessidade, e precisão nas análises, surgiram técnicas eficientes e mais precisas para análise de ânions ou cátions. Além disso, também era possível a análise de vários compostos a partir de uma mesma corrida, diferentemente das técnicas existentes até então. Os primeiros informes sobre estas técnicas deram-se na década de 50 com o surgimento da cromatografia gasosa (GC), na década de 70 pelo aperfeiçoamento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A partir da década de 80, surge a eletroforese capilar (CE), com alto poder de resolução, e capacidade de analisar ânions de forma individual (TAVARES et al.,1997). Paralelamente ao desenvolvimento de novas metodologias, exigências quanto ao fornecimento de alimentos também eram elaboradas na forma de leis, nesse caso, surgiam as regulamentações quanto ao teor de aditivos, agrotóxicos, metais, entre outros.

A composição química das frutas e dos sucos industrializados é uma indicação importante para agregar valor aos seus produtos comercializados, compor normas, e identificar a sua origem geográfica (LUYKX et al., 2008), além disso, a produção dos sucos industrializados requer diluição com água, adição de aditivos e conservantes, o que pode tornar difícil a determinação dos ácidos orgânicos naturais (CASTIÑEIRA et al., 2000; ARELLANO et al., 1997, SAAVEDRA et al., 2000; YANG et al., 2000, MATO et al., 2007).

Dependendo do tipo de análise química, várias metodologias analíticas são utilizadas para definir a composição química de um alimento, dentre elas podem-se citar: as espectrofotométricas, enzimáticas, cromatográficas ou eletroforéticas (MATO et al., 2005).

A eletroforese capilar, principalmente a modalidade de zona, é discutida com ênfase nessas duas últimas décadas devido a eficiência na separação e quantificação de ácidos orgânicos em frutas, gêneros alimentícios e em plantas, sobressaindo-se em relação a outros métodos analíticos como a HPLC (HERNÁNDEZ et al., 2006; SCHERER et al., 2008; VIGNOLI et al., 2007; SUÁREZ et al., 2008; QUIRÓS et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2009), uma vez que o volume dos reagentes e da amostra são na ordem de nanolitros, menor tempo de análise, facilidade de operação instrumental, e baixo impacto ambiental, com pouca geração de resíduos (WU et al., 1995; SCHIEWE et al., 1995; TREVASKIS et al., 1995; ARELLANO et al., 1997; CHOI et al., 1997; FUKUSHI et al., 1997; HORIE et al., 1998; SOGA et al., 1999; SAAVEDRA et al., 2000; CASTIÑEIRA et al., 2000; FUNG et al., 2001; CASTIÑEIRA et al., 2002; XU et al., 2002; FUNG et al., 2003; GALLI et al., 2004; VICKERS et al., 2007; MATO. et al., 2007, TANG. et al., 2007; PERES et al., 2009).

Considerando os inúmeros benefícios em relação ao consumo de ácidos orgânicos, sua determinação em sucos de frutas frescos e industrializados é importante para avaliar a relação entre consumo e saúde humana, importante também na padronização e monitoramento dos sucos industrializados, obtidos a partir de polpas de frutas in natura. Os ácidos orgânicos são os responsáveis pelas propriedades organolépticas dos sucos de frutas frescos e industrializados, dando sabor e aroma, característicos de cada um.

A partir do que foi apresentado, quanto a importância dos ácidos orgânicos presentes nos sucos de frutas e nos sucos industrializados, e considerando que pouco se sabe sobre a composição química de algumas frutas, especialmente aquelas produzidas e comercializadas no Nordeste, assim o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método eletroforético para determinação de ácido oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa em

sucos de frutas frescos de uva, laranja, limão, carambola, morango, umbu cajá, caju, e em sucos industrializados tais como, misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, misto de maçã, laranja, tangerina e limão, misto de laranja, tangerina e limão, misto de maçã, limão e uva, e suco de goiaba, todos comercializados nos mercados e supermercados das cidades de Lagarto, Itabaiana e Aracaju/SE.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinar ácido oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa em sucos de frutas frescos e em sucos de frutas industrializados empregando a eletroforese capilar de zona.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 – Estabelecer as condições adequadas para análise dos ácidos oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa, por eletroforese capilar de zona;

2.2.2 – Desenvolver o procedimento analítico;

2.2.3 – Validar o método, com técnicas univariadas;

2.2.4 – Avaliar a estabilidade dos ácidos orgânicos nos sucos, considerando o tempo e as condições de armazenamento;

2.2.5 – Aplicar o método desenvolvido para análise de suco de fruta fresco e industrializado;

2.2.6 – Colaborar significativamente com informações sobre a distribuição de ácidos orgânicos em sucos de frutas produzidos em Sergipe.

3. JUSTIFICATIVA

Como todos os sistemas vivos, os seres humanos precisam de um fluxo contínuo de energia e provisão de nutrientes essenciais na sua dieta, estes devem ser obtidos em quantidades e proporções apropriadas, pois excesso ou deficiência de nutrientes pode provocar enfermidades (MONTGOMER et al., 1994). Desde as grandes navegações, quando os piratas passavam dias em navios sem uma alimentação balanceada em vitaminas, tinham problemas freqüentes com doenças em função da má alimentação, uma delas, por exemplo, conhecida como escorbuto, a qual ocorria pela carência de vitamina C (LEHNINGER, 2004), a qual bloqueia o processo da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio (ANGELO et al., 2007). Além do ácido ascórbico, há outros ácidos orgânicos com inúmeros benefícios, e estes podem ser encontrados facilmente em frutas e alimentos diversos, os quais fazem parte da constituição das vitaminas, agindo de forma específica na formação, crescimento e regulação hormonal. Atuam também na estabilidade microbiana, permitindo o monitoramento de sucos industrializados além de possibilitar sabores e aromas agradáveis característicos de cada fruta (RIVASSEAU et al., 2006).

A indústria de frutas tem-se expandido bastante nos últimos anos, notadamente no nordeste brasileiro. As unidades fabris se compõem, em sua maioria, de pequenos produtores que utilizam plantios artesanais. Além da comercialização das frutas como frutos, há também a comercialização da polpa de frutas congeladas, a qual vem ganhando grande popularidade, não só entre as donas de casa, mas também em restaurantes, hotéis, lanchonetes, hospitais, etc, nos quais são utilizadas, principalmente, na

elaboração de sucos, devido a alta praticidade e facilidade de preparação e consumo (SCHERER et al., 2008).

As frutas são consideradas fonte nutricional de vitaminas, as quais possuem altos percentuais de ácidos orgânicos, minerais e carboidratos solúveis, sendo que algumas possuem teor mais elevado de um ou de outro nutriente como, por exemplo, a acerola que apresenta elevada quantidade de vitamina C (CHOI et al., 1997). Além do ácido L – aa, outros ácidos orgânicos estão extensamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, tais como, ácido tartárico, cítrico, gálico e L – aa, onde suas concentrações dependem de fatores como espécie, solo e circunstâncias de estresse submetidas. Em todos os países, os levantamentos estatísticos revelam números crescentes de consumo de frutas, tanto per capita quanto global, esses valores são mais expressivos quando se referem às cultivadas em meio orgânico, pelo fato do mesmo evitar o uso de agrotóxicos, os quais prejudicam o organismo humano, trazendo doenças, e má formação hormonal (TAPIA, 2000).

Os ácidos orgânicos são também largamente utilizados como acidulantes na fabricação de bebidas à base de frutas e vegetais, sendo os principais utilizados para realçar sabores como o cítrico e o tartárico. Além disso, o cítrico é muito utilizado como acidulante em sucos de frutas, porque o pH dos ácidos naturais não é suficiente para assegurar a estabilidade microbiana a longo prazo. O ácido ascórbico é amplamente utilizado como antioxidante em sucos, entretanto, por causa de sua natureza, é oxidado durante o período de estocagem. A literatura apresenta alguns relatos sobre a estabilidade do L – aa em sucos de frutas (RONCADA et al., 1977; CHOI et al., 1997; TAVARES et al., 2000; SILVA et al., 2004; HERNÁNDEZ et al., 2006; WU et al., 2007; SCHERER et al., 2008) e há pouco material sobre a estabilidade dos ácidos oxálico, tartárico, cítrico e gálico nos sucos de frutas.

Diante da facilidade de se encontrar frutas ricas em ácidos orgânicos na região Nordeste, mais especificamente no Estado de Sergipe, nas cidades de Lagarto, Itabaiana e Aracaju, e com o objetivo de se avaliar a estabilidade durante o tempo de estocagem da fruta em temperaturas distintas, e dos sucos industrializados, neste trabalho, é utilizado um sistema

eletroforético capilar de zona (CZE) simples, de fácil manuseio, preciso, de baixo custo, com pouca geração de resíduos, para a análise de ácidos orgânicos em sucos, sendo que a principal vantagem desta técnica de separação em relação às outras é a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise e com a utilização de volumes pequenos da amostra (1 a 10 nL por injeção) e do eletrólito de trabalho (10 a 100 mL diários) (JARGER et al., 2001). O sistema empregado neste trabalho é considerado caseiro, pois foi montado no laboratório de pesquisa do Campus de Itabaiana. As otimizações dos parâmetros eletroforéticos, tais como: voltagem requerida, tempo de injeção, concentração, pH e o uso de solvente orgânico na solução de separação, foram fundamentais para o sucesso do método proposto. Como os analitos são ácidos orgânicos, e que formam complexos aniônicos com ácido bórico, empregou-se a estratégia de inverter o fluxo eletroosmótico utilizando um inversor de fluxo na solução de separação, como descritos nos seguintes trabalhos propostos (SCHIEWE et al., 1995; WU et al., 1995; TREVASKIS et al., 1995; FUKUSHI et al., 1997; CHOI et al., 1997; ARELLANO et al., 1997; HORIE et al., 1998; SOGA et al., 1999; DAVEY et al., 1999; SAAVEDRA et al., 2000; CASTIÑEIRA et al., 2000; YANG et al., 2000; FUNG et al., 2001; CASTIÑEIRA et al., 2002; XU et al., 2002; FUNG et al., 2003; WANG et al., 2003; Galli et al., 2004; RIVASSEAU et al., 2006; VICKERS et al., 2007; WU et al., 2007; TANG Y. et al., 2007; MATO et al., 2007; PERES et al., 2009).

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. ÁCIDOS ORGÂNICOS (OXÁLICO, TARTÁRICO, CÍTRICO, GÁLICO e o L – aa) EM AMOSTRAS DE SUCOS DE FRUTAS

Os ácidos orgânicos são compostos orgânicos que apresentam um ou mais grupos carboxílicos em sua estrutura, e podem ser facilmente encontrados em frutas onde participam de suas propriedades organolépticas, dando cor, aroma e sabor, além de possibilitar que uma determinada fruta possa ser caracterizada como sendo de uma região. Os ácidos em estudo são não aromáticos com exceção do ácido gálico, e com pequena cadeia molecular. O ácido oxálico é um dicarboxílico de nome oficial ácido etanodióico, descoberto em 1960 por J.C. Wiegand, de fórmula $H_2C_2O_4$, encontrado em frutas como a carambola, o qual pode ser utilizado em consultórios dentários (tratamento contra o tártaro). Na indústria, como eliminador de ferrugem em mármore, metais e pedras, obtenção de corantes e fixação em tecidos, fabricação de tintas, branqueamento de têxteis, papéis, curtiça, palha, curtição industrial de couros, e fabricação de oxalatos. No que se refere ao seu consumo, tóxico se ingerido puro, porém, em frutas o percentual existente é baixo, não representando danos à saúde. O grande consumo deste ácido pode trazer algumas patologias, como por exemplo: geração de cisteína, doença conhecida como pedras nos rins, além de descalcificação óssea.

Ácido tartárico é um ácido orgânico de função mista, álcool e ácido carboxílico, descoberto em 1770 por C.W. Scheele, de nome oficial ácido dihidroxi-butanodióico, de fórmula $H_6C_4O_6$, encontrado principalmente em frutas como: uva, tamarindo, abacaxi e amora. Pode ser utilizado como

acidulante em vinhos, ou na fabricação de tinturas, xampus anti-cálvice, uma vez que estimula a corrente sanguínea no local da aplicação.

Ácido cítrico é um tricarboxílico com a presença de uma hidroxila, de nome usual, ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, de fórmula $H_8C_6O_7$, descoberto em 1784 por C.W. Scheele, encontrado principalmente em frutas cítricas, dentre elas, o limão, laranja e umbu. Possui elevado poder complexante, auxilia na formação óssea, fixando cátions como cálcio, ferro, potássio e magnésio. Também atua como agente tamponante participando da estabilização do pH de meios aquosos, além de ser o principal agente de alcalinização do metabolismo humano; participa da respiração celular e geração da energia humana iniciais do Ciclo de Krebs. Quando ingerido, transforma-se em sal alcalino (formando citratos de cálcio, magnésio, ferro e potássio) neutralizando a acidez do estômago. Também é conhecido como um bactericida seguro e natural contra fermentações no estômago e intestinos, também é utilizado nas desintoxicações em geral, inclusive nas causadas por ingestão de soda ou potassa cáustica, serve como acidulante e participa da defesa imunológica do organismo humano (TAPIA, 2000).

Ácido gálico é um ácido orgânico aromático de nome oficial 3,4,5-triidroxibenzóico, de fórmula $H_6C_7O_5$ descoberto em 1786 por C.W. Scheele, encontrado em frutas como goiaba e amora e considerado um antioxidante.

Ácido ascórbico (L – aa) é o enantiômero mais ativo biologicamente da vitamina C (EVANGELISTA, 2006), de nome oficial R-3,4-dihidroxi-5-(S)-1,2-dihidroxi-etilfurano-um-2(5H) de fórmula $H_8C_6O_6$, isolado primeiramente em forma cristalina pura, a partir do suco de laranja, pelos bioquímicos norte americanos C.G. King e W.A. Waugh, em 1932 (LENHNINGER, 2004). Pode ser encontrado em frutas como acerola, morango, mamão, laranja e kiwi. É um ácido orgânico altamente oxidante que transforma os radicais livres de oxigênio em formas inertes, protegendo do envelhecimento e da degeneração de todas as células e tecidos, rege as funções da medula óssea, participando do metabolismo de formação do sangue e desempenho das glândulas endócrinas. Auxilia na formação dos tecidos fibrosos, dos dentes, dos ossos, das cartilagens, da pele e até dos cabelos, favorece a reconstituição de ossos e cartilagens como também na cicatrização dos

cortes e feridas, eficaz no tratamento e prevenção do escorbuto, anemia, reconstituição de tecidos, fortalecimento do sistema imunológico, agindo também de forma eficaz em problemas digestivos e circulatórios (LENHNINGER, 2004).

A Figura 1 e a Tabela 1 mostram algumas características físico-químicas dos ácidos orgânicos estudados neste trabalho. Os dados mostrados na Tabela 1 foram extraídos de Cheng et al., 2006 e Olsson et al. 1998.

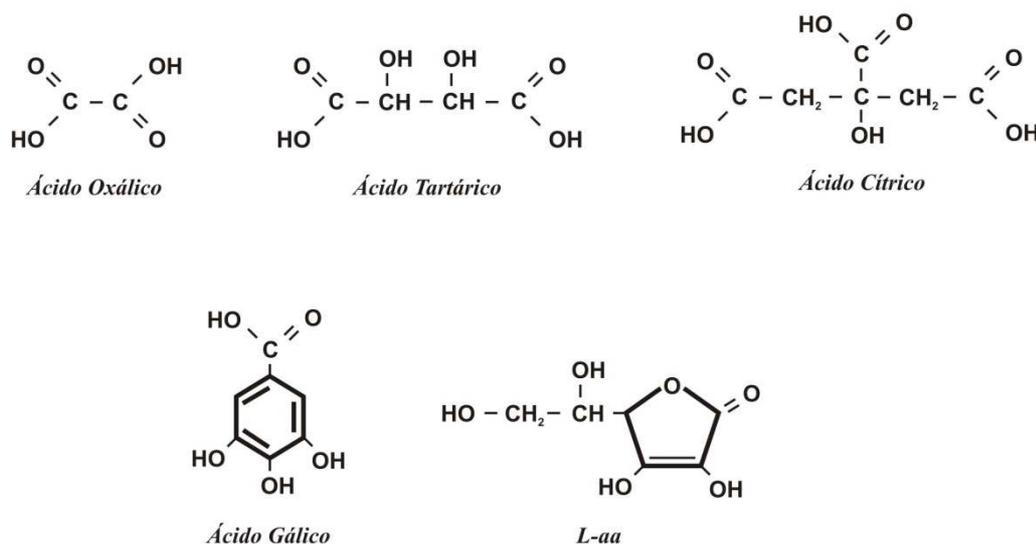


Figura 1 – Estrutura química dos ácidos orgânicos estudados: oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa.

Tabela 1 – Mobilidade eletroforética e número de grupamentos ácidos (NG) e de átomos (NA) dos ácidos estudados.

ÁCIDO	NG	NA	Massa molecular (g)	Mobilidade eletroforética ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$)
Oxálico	2	8	90	74,6
Tartárico	2	16	150	60,5
Cítrico	3	21	192	70,8
Gálico	1	18	170	34,4
Ascórbico	1	20	176	$2,41 \times 10^{-8}$ (1)

(1) Olsson et.al. 1998.

De acordo com Cheng et al., 2006, a mobilidade eletroforética (μ_{ef}) aumenta com o aumento do número de grupos ácidos e diminui com o aumento do número de átomos e massa do ácido. Dentre os ácidos estudados, a ordem de migração é: ácido oxálico, cítrico, tartárico, gálico e ascórbico.

4.2. ASPECTOS GERAIS DA ELETROFORESE CAPILAR

4.2.1. TIPOS DE ELETROFORESE CAPILAR

Podem ser encontradas na literatura 6 técnicas eletroforéticas, eletroforese capilar de zona (ECZ), conhecida também como eletroforese capilar em solução livre (ECSL), eletrocromatografia micelar (EM) ou cromatografia eletrocinética micelar (CEM), eletroforese capilar em gel (ECG), focalização isoeletrica capilar (FIC), isotacoforese capilar (IC) e eletroforese por fronteira móvel. Dentre elas destaca-se a ECZ por ser de fácil operação, envolvendo somente um único eletrólito de separação, onde os analitos presentes numa mistura são separados em função de suas mobilidades individuais, e a mobilidade do meio em que se encontram.

Todas essas técnicas empregam um campo elétrico, que possibilita a formação de um fluxo eletroosmótico, promovendo a migração dos analitos até o detector. A migração é diferenciada por alguns aspectos, dentre eles, a forma de interação dos analitos, com os constituintes das soluções tampão dentro do capilar.

A técnica de fronteira móvel diferencia-se da ECZ devido a separação completa de todos os componentes nunca ser atingida, apenas os componentes de maior mobilidade são parcialmente purificados, enquanto que as outras bandas sofrem diversos graus de sobreposição. A ECZ também é uma técnica eletroforética por fronteira móvel, porém, quando o potencial elétrico é estabelecido, os componentes migram em zonas com velocidades constantes, mas diferenciadas, características de suas próprias mobilidades, e da mobilidade das moléculas que constituem a solução tampão.

Em ECZ, uma solução altamente básica é utilizada para preparar o capilar. Essa solução dissocia os grupos silanóis, constituinte da parede interna do capilar de sílica fundida, em seguida, adiciona-se uma solução tampão, contendo o eletrólito de separação e, se necessário, inversores de fluxo para análise de ânions. Desta forma, obtêm-se dois movimentos simultâneos, a migração eletroforética dos íons e a eletroosmose, ou seja, fluxo de solução induzido pelo campo elétrico, o qual possibilita uma alta eficiência da técnica (GALLI et al., 2004).

Em EM e ECG, as mobilidades eletroforéticas são semelhantes a mobilidade eletroforética da ECZ, porém, diferenciam-se pelo modo de como foi preparado o interior do capilar. Em EM, é adicionado dentro do capilar um aditivo que possibilita a formação de uma fase secundária, esta pode adsorver certa quantidade de analito, não reproduzindo no seu tempo de migração, porém, é eficaz tanto na análise de íons como na de neutros, o qual não se observa com a ECZ, que não é eficaz na separação de compostos neutros. Em ECG, faz-se um pré-tratamento do capilar com o reagente como, por exemplo, o 3-metacriloxi-propil-trimetoxi-silano, o qual elimina o fluxo eletroosmótico através de uma ligação covalente com os grupos silanos da superfície capilar e evita a extrusão do gel durante a operação do sistema adicionando em seguida um gel, o qual possibilita a dissipação do efeito joule, porém, o uso dessa modalidade eletroforética pode reter analitos ou parte deles, não reproduzindo nos seus tempos de migração (TAVARES, 1997).

Em IC, utiliza-se uma solução tampão, contendo dois eletrólitos de separação, sendo que um deles é chamado de eletrólito líder e o outro terminador, eficiente tanto na análise de ânions como na de cátions, porém, para análise de ânions, o eletrólito líder deverá conter um ânion de maior mobilidade em relação ao ânion do analito, e o eletrólito terminador deverá conter um ânion de menor mobilidade em relação ao ânion do analito. Para a análise de cátion, o eletrólito principal deverá conter um cátion de maior mobilidade em relação ao cátion do analito, enquanto que o cátion do eletrólito terminador deverá conter uma menor mobilidade em relação ao cátion do analito.

A análise por FIC envolve a separação de solutos anfotéricos em um gradiente de pH, sob a influência de um campo elétrico, um soluto negativamente carregado migra em direção ao ânodo. Durante esse percurso, o soluto experimenta regiões de pH progressivamente menor, tornando assim, uma fração cada vez maior do soluto protonado, alterando a carga efetiva durante a migração. Eventualmente, a carga total do soluto torna-se zero, e sua migração é interrompida. Cada componente da amostra migra para uma região de pH igual ao seu ponto isoelétrico, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante (LINDEBERG, 1996).

4.2.2. INSTRUMENTAÇÃO

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. Na Figura 2 está uma ilustração mostrando os componentes de um sistema caseiro para implementar a eletroforese capilar de zona, o qual consiste de uma fonte de alta tensão, um capilar geralmente de sílica fundida, eletrodos, geralmente de platina, e um detector apropriado por absorção molecular na região do ultravioleta/visível. Uma fonte regulada de alta tensão é usada para estabelecer o campo elétrico ao longo do capilar. Tais fontes podem em geral ser operadas a voltagem constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0 – 30 kV e corrente, de 0 – 200 μ A (TAVARES, 1997). A fonte de alta tensão é conectada por meio de eletrodos de platina a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólito conveniente.

O tubo capilar de sílica fundida preenchido com a solução eletrolítica serve como canal de migração para os analitos. Logo após a introdução da amostra dentro do capilar, as extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução tampão para fechar o circuito elétrico. Normalmente, a temperatura é mantida constante durante a análise química, para manutenção da termoestabilização.

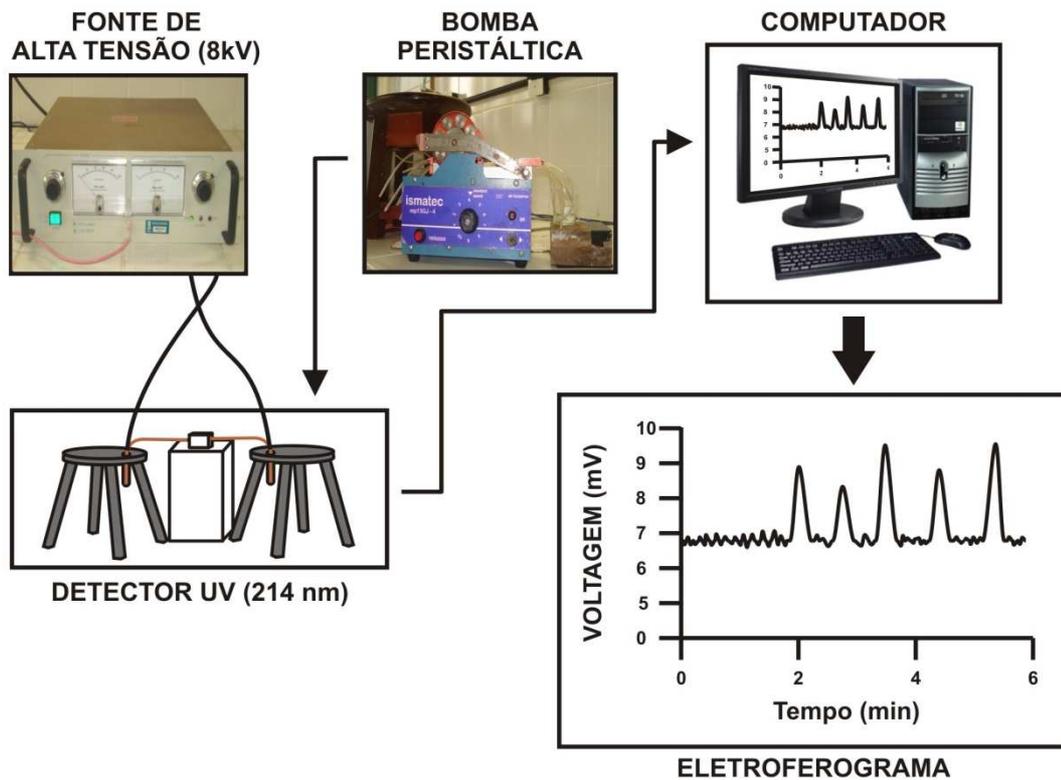


Figura 2 – Sistema eletroforético caseiro.

4.2.3. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

Na eletroforese capilar de zona, o processo de separação ocorre em uma coluna capilar de diâmetro interno entre 25 e 100 μm , e comprimento entre 30 e 100 cm, normalmente de sílica fundida e recoberta com um material inerte que é removido para a confecção de uma janela de observação. O capilar é preenchido com uma solução tampão que é eletrolítica, a qual conduz a corrente elétrica que passa pelo sistema, e contém um eletrólito de separação, onde os analitos são separados. Aqui é importante enfatizar que no modo eletroforético capilar de zona, a migração dos analitos ocorrerá em blocos e a formação desses blocos dependerá da mobilidade eletroforética dos cátions e ânions, enquanto que os neutros migrarão todos em um único bloco, não sendo, separados e detectados individualmente (BECKERS et al., 2001). A evolução da separação ocorre da seguinte forma: No momento em que os íons são introduzidos no capilar, os cátions tendem a migrar para o pólo negativo, e os ânions para o pólo

positivo, porém, sob efeito de um campo elétrico, obtido com voltagem ou corrente constante, ocorre a formação de um fluxo eletrosmótico no sentido do pólo negativo em direção ao pólo positivo, representado por (EF+EOF), como mostrado na Figura 3. Isto ocorre devido a dissociação da sílica que atrai cargas positivas para a sua superfície (BAKER, 1995).

Fatores como pH da solução tampão, inversão de fluxo eletrosmótico, adição de agentes complexantes e voltagem afetam a velocidade de migração dos íons (CRASTON et al., 1998).

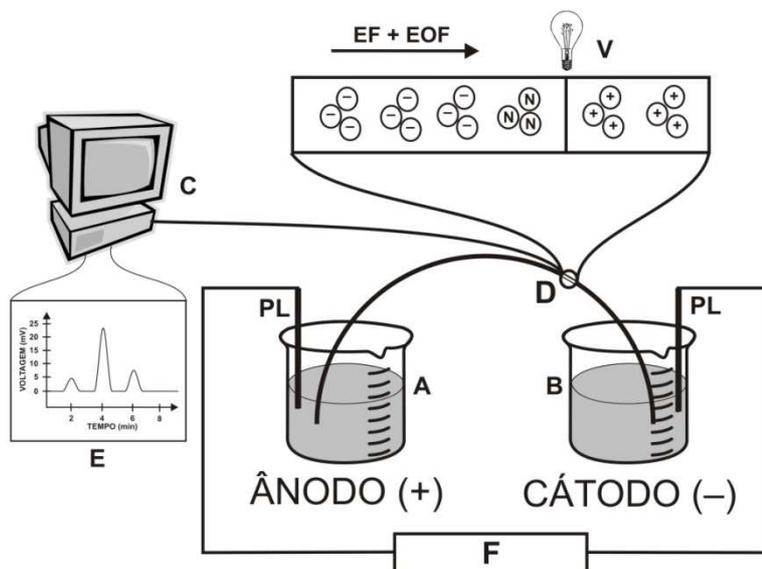


Figura 3 – Sistema CE. A e B – recipientes contendo solução eletrolítica, onde se encontram os eletrodos de platina (PL), (F) – fonte de potência (V) – fonte de radiação, (D) – detector acoplado a um computador – (C), (EF) – fluxo eletroforético, (EOF) – fluxo eletrosmótico, (E) – eletroferograma. Os círculos brancos representam os íons, os sinais negativos e positivos indicam as cargas.

4.2.4. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

A forma de introdução da amostra no capilar tem implicações significativas na análise instrumentação, pois afeta a repetibilidade da área ou da altura do pico, os quais refletem a precisão da técnica de injeção. Em eletroforese capilar de zona, a amostra pode ser introduzida no capilar por dois métodos distintos, electrocinético ou hidrodinâmico.

Na injeção hidrodinâmica a amostra é introduzida no capilar por um gradiente de pressão, no qual pode ser estabelecido por diferentes mecanismos de pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro. Neste trabalho, a amostra foi introduzida no capilar elevando a extremidade catódica a 4,5 cm, tal como pode ser visto na Figura 4. Na injeção eletrocinética, a solução é inserida no capilar com auxílio de um gradiente de potencial, o qual é estabelecido por todo comprimento do capilar num período de tempo conhecido.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra, no qual o volume injetado (nL) depende do tempo de injeção (t), e da altura de sua aplicação (h), quando a injeção for feita por diferença de altura entre os dois frascos que contém as soluções eletrolíticas. Este tipo de injeção é usualmente mais precisa que a eletrocinética porque é baseada estritamente na transferência de volume, (GALLI et al., 2003) diferentemente da injeção eletrocinética uma vez que o volume aplicado é diretamente proporcional a voltagem aplicada (V), a concentração da amostra (C), ao tempo de injeção (t), ao raio interno do capilar (r), a mobilidade aparente (μ_{ap}) e a mobilidade eletroforética (μ_{eof}), e inversamente proporcional ao comprimento total da coluna (L) (ALTRIA, 1996).

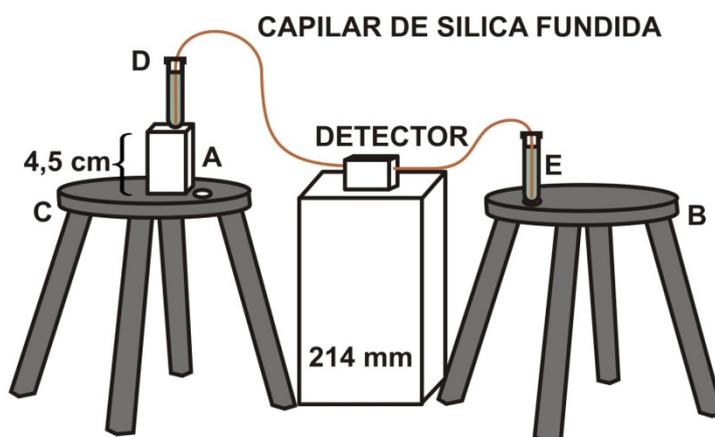


Figura 4 – Diagrama do sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade: A cubo de isopor; B e C suporte de madeira; D e E frascos contendo a solução eletrolítica.

4.2.5. SOLUÇÃO TAMPÃO

Para uma boa separação dos analitos em CZE, os parâmetros eletroforéticos devem ser avaliados, principalmente em relação à solução tampão, associado com o tipo de capilar utilizado. Para capilares de sílica fundida, o pH da solução tampão deverá estar entre 2,0 e 11,0, uma vez que em pH abaixo de 2,0, os grupos silanóis estarão totalmente protonados, em pH 10,0 há o número máximo de dissociação dos grupos silanóis e, a partir do pH 11,0, a formação do fluxo eletrosmótico será constante, Figura 5. O tampão terá boas respostas na separação quando o seu pH for correspondente ao pKa do eletrólito de separação, com variação de \pm uma unidade. A concentração do eletrólito deverá estar numa faixa que varie de 5 a 200 mmol/L, uma vez que, ao utilizar uma concentração eletrolítica muito baixa, pequenas quantidades de analitos podem ser adsorvidas pela coluna, não reproduzindo seus tempos de migração, e utilizando altas concentrações do eletrólito, poderá ocorrer um super aquecimento no interior da coluna, denominado efeito Joule, o qual prejudica na separação dos analitos (LANDERS, 1997).

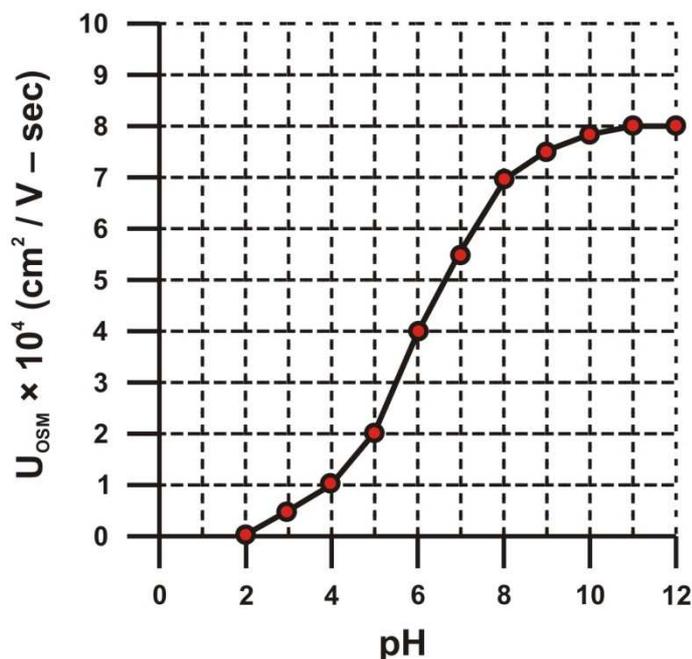


Figura 5 – Influência do pH da solução tampão sobre a mobilidade do fluxo eletrosmótico.

4.2.6. ADITIVOS

O uso de eletrólitos aditivados é bastante comum em CZE, uma vez que o aditivo altera a mobilidade eletroforética do soluto; modifica o fluxo eletroosmótico; solubiliza soluto ou composto na matriz da amostra, e reduz a interação de certos solutos com a parede interna do capilar, minimizando a adsorção. Na Tabela 2, ANEXO B, estão relacionados os principais aditivos eletrolíticos empregados em CE.

4.2.7. DETECTORES

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: universais e específicos. Os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Assim, o sinal não depende das propriedades dos solutos, mas das propriedades do soluto e solução. Nesta classe, estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Apesar de universais, esses detectores apresentam menor sensibilidade e intervalo dinâmico. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto, a detecção é limitada aos solutos que possuem a referida propriedade. Nesta classe, estão incluídos os fotodetectores baseados na absorção na região do UV/VIS, na fluorescência ou no espalhamento Raman, os espectrômetros de massa, os detectores amperométricos e os radiométricos. (TAVARES, 1996, KLAMPFL, et al., 2000).

O uso dos detectores específicos é bastante vantajoso quando a matriz da amostra é complexa e em situações nas quais é desejável minimizar interferências de radiação de fundo. Este tipo de detector é geralmente mais sensível do que os detectores universais e fornecem intervalos mais amplos de resposta linear. Além disso, a relação sinal/ruído é melhor. Consequentemente os detectores específicos encontram maior uso que os universais.

Os principais métodos de detecção são:

Métodos ópticos - absorção de luz na região do ultravioleta-visível ou infravermelho, fluorescência, índice de refração, Raman, absorbância termo-óptica e quimiluminescência. Métodos eletroquímicos - amperométricos, voltamétricos, condutométricos e potenciométricos. Outros métodos e métodos acoplados - ressonância magnética nuclear, radiométricos, espectrometria de massas e de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (SILVA, 2003).

Os detectores são acoplados aos capilares eletroforéticos, que geralmente são constituídos de uma camada externa de poliimida. Para o acoplamento do capilar com o detector faz-se uma remoção de uma pequena parte de camada da poliimida, onde realiza o acoplamento, e este pode ocorrer de três maneiras distintas: quando o detector se posiciona numa parte que não seja a extremidade do capilar, este é conhecido como *on column*, se o detector encontra-se na extremidade de saída da coluna, tem-se um acoplamento *off column*, porém, se a separação dos analitos ocorrer por CE, e a injeção da porção separada ocorrer em outro detector, esta é conhecida como *end column*. Neste trabalho empregou-se o modo *on column*, conforme Figura 6.

O desenvolvimento de novos sistemas de detecção em eletroforese capilar tem sido uma área de intensa pesquisa desde a implementação da técnica (MIRANDA et al., 2002). Alguns detectores, de uso geral para cromatografia líquida, são adaptados para eletroforese capilar. Além disso, a diversidade de moléculas que se beneficiam do uso de métodos eletroforéticos tem contribuído para a implementação de uma variedade de princípios de detecção.

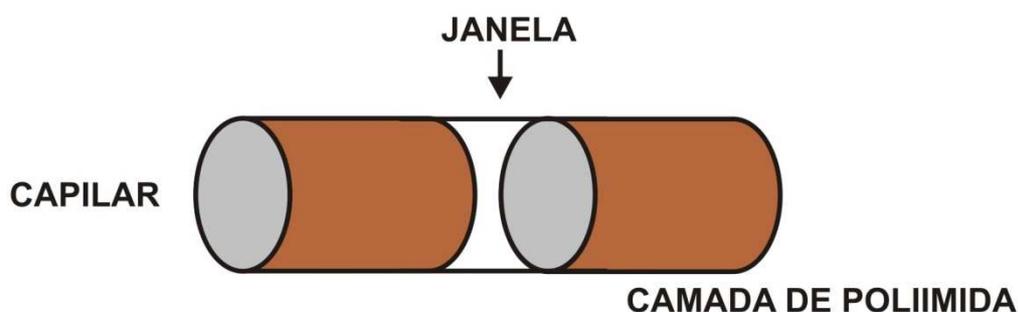


Figura 6 – Capilar de sílica após a remoção de poliimida.

4.2.8. CAPILARES

Os capilares mais usados possuem tamanho que variam de 30 a 100 cm de comprimento, com diâmetro interno que varia de 25 a 75 μm , e diâmetro externo até 375 μm , são de sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo, o qual lhe confere muitas propriedades importantes, como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica e particularmente, alta transmissão óptica para um intervalo apreciável do espectro (190 a 900 nm). Quimicamente, os capilares de sílica são caracterizados pela presença de vários grupos silanos (SiOH). (BAKER, 1995).

O uso de tubos com dimensões capilares minimiza as limitações relativas ao efeito joule, já que a geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica. Com isso, obtêm-se campos elétricos elevados, resultando em maior eficiência e redução do tempo de análise (BONATO et al., 2005). A poliimida, na parte externa da coluna, auxilia na movimentação do capilar e, conseqüentemente evita a sua ruptura.

4.2.9. AGENTES MODIFICADORES DA SUPERFÍCIE CAPILAR

Vários procedimentos são utilizados para o controle da densidade de carga na parede do capilar, visando tanto o controle do fluxo eletroosmótico quanto a eliminação da interação soluto-capilar. O uso de capilares revestidos internamente é uma prática comum, nestes capilares, os grupos silanóis são bloqueados quimicamente pela reação com ligantes polares do tipo organosilanos (trimetilclorosilano, γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano), entre outros. Este tipo de revestimento tem-se mostrado efetivo por um período de tempo limitado, devido à hidrólise reversível do oxigênio ligado ao silício, particularmente em valores altos de pH (CAMILLERI, 1993).

Uma forma de manipulação da carga superficial do capilar é a desativação dinâmica que decorre da adsorção física de agentes tensoativos

catiônicos, tais como os alquil derivados dos sais quaternários de amônio, a escolha adequada do tamanho da cadeia do tensoativo, como sua concentração, permite o controle direto da magnitude do fluxo eletroosmótico e mesmo a sua inversão (COLOMBARA et al., 1997).

4.2.10. FLUXO ELETROOSMÓTICO (FEO)

Para a formação do fluxo eletroosmótico (FEO), utiliza-se geralmente uma solução altamente básica, normalmente de hidróxido de sódio, e uma solução tampão contendo um eletrólito de separação, da seguinte forma: A solução básica, ao passar pela cavidade interna do capilar, dissocia os grupos silanos presentes na parede interna do capilar, em seguida, íons da solução tampão são atraídos para a parede do capilar e formam uma camada carregada positivamente, denominada de camada fixa. Como essa camada não é suficiente para neutralizar todas as cargas da parede, uma segunda camada carregada também positivamente é formada. Esta última é denominada de camada móvel. Entre essas duas camadas forma-se um potencial denominado potencial zeta (ζ), o qual possibilita a migração da camada móvel em direção ao cátodo (-). As moléculas de água que solvatam o analito também contribuem para o deslocamento desta camada móvel ao longo do capilar, esta força, responsável pelo transporte das espécies iônicas ao longo do capilar é denominada de fluxo eletroosmótico (FEO), (Figura 7).

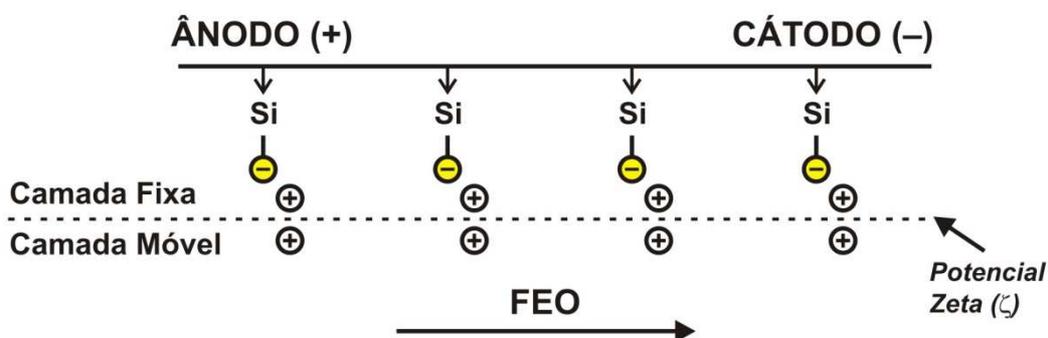


Figura 7 – Formação do fluxo eletroosmótico.

O FEO depende diretamente do pH do eletrólito de separação, pois a carga do capilar (C) é governada pela ionização dos grupos silanóis. Com o incremento de pH de dois até oito, o fluxo eletrosmótico pode ser aumentado até 10 vezes, em valores de pH menores que dois não há fluxo eletrosmótico, pois a maior parte dos grupos de silanóis está protonado (TAVARES, 1996). Outro fator fundamental no controle do FEO é o tipo de revestimento interno da parede do capilar (HSIEH et al., 1998).

A alta concentração de eletrólitos no tampão, quando a temperatura é controlada, leva a um decréscimo do FEO, pois elimina o potencial zeta. A adição de modificadores como solventes orgânicos têm efeito variável, pois afetará a viscosidade, constante dielétrica e potencial zeta, a influência deste dependerá também da quantidade adicionada; por exemplo, adicionar metanol à água aumenta a viscosidade da solução até a concentração de 50% (v/v) diminuindo desta forma a mobilidade da solução eletrolítica. (SARMINI et al., 1997).

O perfil do fluxo eletrosmótico é do tipo radial, o que implica dizer que as moléculas se movimentam em velocidades muito próximas, diferentemente do fluxo pressurizado, o qual apresenta um perfil de velocidade parabólico, como pode ser visto na Figura 8, isto significa uma vantagem do fluxo eletrosmótico, uma vez que permite uma maior eficiência na separação dos picos.

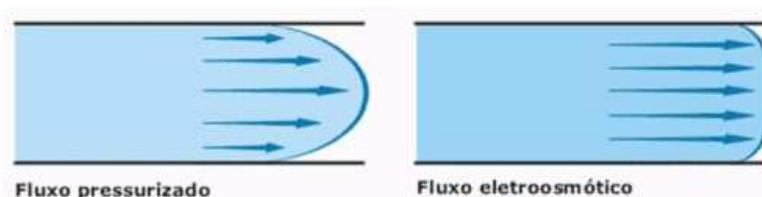


Figura 8 – Esquema ilustrando as diferenças entre o perfil do fluxo pressurizado e o eletrosmótico.

4.2.11. INVERSÃO DO FLUXO ELETROSMÓTICO

Agentes surfactantes são utilizados em CE, para modificação do meio interno do capilar, dentre eles, a inversão do fluxo eletrosmótico, o uso teve início com o trabalho pioneiro de D. W. Fuerstenau, que estudou o efeito de

sais quaternários de alquilamônio na magnitude do potencial zeta de esferas de quartzo (COLOMBARA et al.; 1997).

O modelo atualmente aceito para inversão do fluxo está baseado na formação de uma camada de semi-micelas na superfície interna do capilar. (Figura 9). A estrutura (A_0) representa a situação para o fluxo eletrosmótico normal, no qual a superfície está negativamente carregada e os cátions, na proximidade da superfície, estão arranados de acordo com uma dupla camada elétrica. Com a adição do surfactante catiônico ao eletrólito condutor, uma pequena quantidade de monômeros do surfactante desloca os cátions da dupla camada e são adsorvidos na superfície, as forças que governam a adsorção, nesta etapa, são de caráter coulômbica, e atuam entre os sítios de carga negativa da superfície e as cabeças dos monômeros, carregadas positivamente. Quando a concentração do surfactante adicionado ao eletrólito condutor aumenta, a adsorção de monômeros prossegue, e eventualmente, alcança um ponto que todos os sítios de carga da superfície são completamente neutralizados. Este estágio caracteriza a formação de uma monocamada, na qual a cabeça dos monômeros está firmemente ligada à superfície e a cauda voltada para a solução. Desde que, com este arranjo não há carga efetiva na superfície, o fluxo eletrosmótico é suprimido (A_1). Um aumento da concentração do surfactante na solução aumenta a possibilidade de interações coesivas entre as caudas, possibilitando a formação de uma bicamada (A_2), a adsorção das semi-micelas é tal, que uma das cabeças é firmemente ligada à superfície, enquanto que a cabeça diametralmente oposta está voltada para a solução. Uma dupla camada composta de ânions é então organizada na solução interfacial e, sob ação de um campo elétrico, o fluxo eletrosmótico é invertido, ou seja, migra em direção ao anodo (+) (COLOMBARA et al., 1997).

A compreensão do mecanismo de reversão do fluxo e das variáveis que o afetam é necessária, para que a importância relativa de cada um destes fatores seja determinada e levada em consideração, quando a busca de condições apropriadas para otimização da separação de uma determinada mistura se fizer necessário.

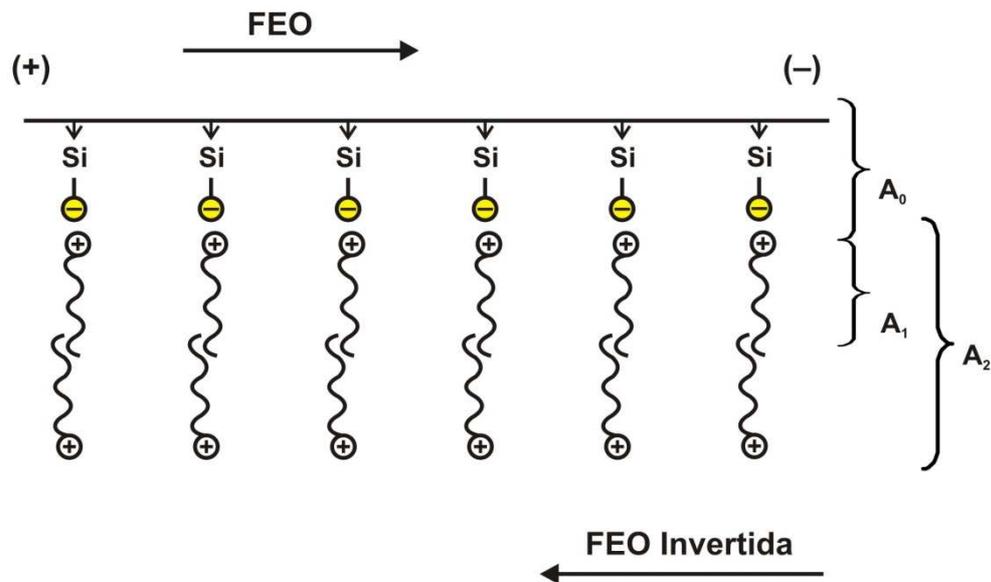


Figura 9 – Representação esquemática da adsorção de surfactantes sobre a superfície interna de capilares de sílica fundida.

4.3. ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA CE

4.3.1. MOBILIDADE IÔNICA

A mobilidade iônica (μ) de um determinado analito é fundamental em ECZ, uma vez que esta indicará o tempo de migração do analito em presença de determinada solução tampão. Cada solução tampão, proporciona um tipo de dissociação específica do analito, possibilitando uma maior ou menor mobilidade iônica, e esta pode ser calculada seguindo a equação 1. Onde a mobilidade é diretamente proporcional a velocidade limite de cada analito (v_i), o qual depende da razão entre a sua carga e o tamanho do raio atômico, sendo que, quanto menor o tamanho do átomo e maior a sua carga, maior a velocidade limite, e inversamente proporcional ao campo elétrico aplicado (E). As equações descritas a seguir foram retiradas das referências bibliográficas (CAMILLERI, 1993; BAKER, 1995; TAVARES, M.F.M. et al., 1997; TAVARES, M.F.M. et al., 1995).

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} \quad (1)$$

A velocidade limite de um analito (v_i) pode ser calculada, considerando a distância percorrida por um íon, num determinado capilar que possuirá comprimento total (L), sobre uma unidade de tempo (t_i), como descrito na equação 2.

$$v_i = \frac{L}{t_i} \quad (2)$$

4.3.2. EFEITO DOS PARÂMETROS ELETROFORÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS DE SEPARAÇÃO

Os parâmetros que influenciam de forma significativa nas separações dos analitos em eletroforese capilar são: tempo de migração, resolução e eficiência.

4.3.2.1. TEMPO DE MIGRAÇÃO

Em eletroforese capilar, o tempo de migração (t_m) de um analito, dependerá do comprimento efetivo da capilar (l) e da velocidade observada (v_{obs}) como mostrado na equação 3.

$$t_m = \frac{l}{v_{obs}} \quad (3)$$

Para o cálculo da velocidade observada (v_{obs}), deve-se considerar a intensidade do campo elétrico aplicado (E) e a mobilidade observada (μ_{obs}), como demonstrado na equação 4.

$$v_{obs} = \mu_{obs} E \quad (4)$$

A mobilidade observada (μ_{obs}) é a soma da mobilidade aparente (μ_{ap}), que representa na verdade a mobilidade do analito com a mobilidade eletrosmótica, (μ_{feo}), formada a partir do fluxo eletrosmótico, como demonstrado na equação 5.

$$\mu_{obs} = \mu_{ap} + \mu_{feo} \quad (5)$$

A intensidade do campo elétrico é expressa pelo valor máximo do gradiente de potencial (V) por unidade de comprimento (L), como descrito na equação 6.

$$E = \frac{V}{L} \quad (6)$$

Logo, substituindo a equação 4 na equação 3, temos a equação 7, a qual relaciona o tempo de migração com a intensidade do campo elétrico e a mobilidade do fluxo eletrosmótico.

$$tm = \frac{l}{\mu_{feo} E} \quad (7)$$

Por fim, ao substituir a equação 6 na equação 7, vemos que o tempo de migração (tm) é diretamente proporcional ao comprimento efetivo (l) e ao comprimento total (L) do capilar, e inversamente proporcional a mobilidade observada (μ_{feo}) e a voltagem aplicada (V) (equação 8), dessa forma é vantajoso o uso de capilares que possuam pequenos comprimentos efetivos (l) e total (L).

$$tm = \frac{lL}{\mu_{feo} V} \quad (8)$$

Ainda podemos expressar o tempo de migração dos analitos em função da mobilidade aparente (μ_{ap}) com a mobilidade efetiva (μ_{feo}), ao substituirmos a equação 5 na equação 8, como mostrado na equação 9.

$$tm = \frac{lL}{(\mu_{ap} + \mu_{feo})V} \quad (9)$$

4.3.2.2. RESOLUÇÃO E EFICIÊNCIA

As equações tradicionais que descrevem resolução e eficiência em CZE incorporam o fenômeno de difusão como única causa de alargamento das zonas, e podem ser escritas, como as representadas pelas equações 10 e 11.

$$RS_{i,i+1} = \frac{1}{4\sqrt{2}} (\mu_{api} - \mu_{api+1}) \left(\frac{V}{D(\mu_{média} + \mu_{feo})} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

$$N = \frac{l(\mu_{ef} + \mu_{feo})V}{2DL} \quad (11)$$

Onde: (μ_{api}) e (μ_{api+1}) são as mobilidades aparentes de dois solutos eluindo em posições adjacentes, ($\mu_{média}$) é a mobilidade média dos solutos, (μ_{ef}) é a mobilidade eletroforética do soluto *i*, (μ_{feo}) é a mobilidade do fluxo eletrosmótico, (*V*) é a diferença de potencial aplicada, (*D*) é a média dos coeficientes de difusão dos dois solutos, (*L*) é o comprimento do capilar e (*l*) é a distancia do ponto de injeção à posição do detector (comprimento efetivo).

As equações 10 e 11 indicam que o uso de voltagens elevadas é vantajoso, pois implica em um ganho de resolução e eficiência. Outra observação pertinente é que, em separação difícil, a resolução de pares de solutos migrando muito próximos pode ser melhorada pelo ajuste da magnitude do fluxo eletrosmótico. Quando a mobilidade eletrosmótica for

aproximadamente igual, mas de sinal oposto à mobilidade dos solutos, um ganho de resolução é alcançado (equação 10), com perda de eficiência (equação 11). (TAVARES, 1997).

4.3.3. TEMPERATURA

As separações dos analitos em CZE são influenciadas pela variação da temperatura, uma vez que esta altera a eficiência, o tempo de migração, o volume de amostra injetado e a resposta do detector. (BAKER, 1995).

Os principais parâmetros considerados no controle da temperatura são:

1 – Voltagem (V) aplicada nas separações, a qual pode ser calculada com auxílio da equação 12. Em CZE existe uma relação linear de voltagem e corrente até um ponto máximo, esse ponto é o ponto que nos permite saber qual voltagem a ser utilizada nas análises, a partir desse ponto não temos mais uma linearidade observada, o qual não possibilitará resultados repetitivos.

$$V = LiR \quad (12)$$

Onde (L) é o comprimento total da capilar, (i) é a corrente aplicada e (R) resistência.

Ao Aumentar progressivamente a voltagem do sistema, pode-se ter um superaquecimento interno da solução, ocasionando o efeito joule. De acordo com a equação abaixo, quanto menor diâmetro interno do capilar menor é o Δt no interior da coluna. A variação da temperatura entre a parede interna do capilar e o seu centro pode ser calculada com auxílio da equação 13.

$$\Delta t = \frac{0,239Qr^2}{4K} \quad (13)$$

Onde: (Δt) é a variação de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), (Q) é a densidade de potência W/m^3 , (r) raio interno do capilar cm e (K) é a condutividade térmica em $\text{W}/\text{cm}\cdot(^{\circ}\text{C})$.

4.3.4. FLUXO ELETROSMÓTICO

Para entender o desenvolvimento do fluxo eletrosmótico é preciso examinar as forças que atuam na proximidade da superfície do capilar, quando um campo elétrico tangencial é estabelecido. A solução dentro do capilar é dividida em camadas concêntricas, onde cada camada possui uma distribuição de íons do tipo Boltzmann, e espessura infinitesimal (dx). As forças atuantes são de natureza elétrica e de atrito, no qual a força elétrica atua em todos os íons presentes no seguimento da solução, sendo proporcional à magnitude do campo elétrico (E) e à densidade da solução (p). (TAVARES, 1996). Portanto pode-se calcular esta força seguindo a equação 14.

$$F_{elétrica} = F_1' = E p dx \quad (14)$$

Outro fator fundamental na formação do fluxo eletrosmótico, é o potencial zeta (ζ), formado a partir da criação de duas camadas difusas positivas, possibilitando que uma delas se mova em direção ao cátodo (-). Pode ser calculado considerando a equação (15), onde: (σ) é a espessura da dupla camada difusa, (e) carga por unidade de área, e (k) é a constante dielétrica do tampão.

$$\zeta = \frac{4\pi\sigma e}{k} \quad (15)$$

A velocidade (v_{feo}) e a mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{feo}) são diretamente proporcionais ao potencial zeta (ζ), e podem ser calculados seguindo a equação 16, e a equação 17 respectivamente.

$$veof = \frac{k\zeta E}{4\pi n} \quad (16)$$

$$\mu feo = \frac{k\zeta}{4\pi n} \quad (17)$$

Onde: (k) é a constante dielétrica do tampão, (E) é o campo elétrico (volts/cm) e n é a viscosidade da solução tampão.

4.3.5. VOLUME INJETADO DA AMOSTRA E COMPRIMENTO DE ZONA

Para avaliar o comprimento inicial da zona, e o volume de amostra injetada no capilar, o modo de injeção precisa ser considerado. Na introdução hidrodinâmica, a amostra é injetada no capilar por uma pressão criada pela diferença de gravidade ou por vácuo em uma das extremidades do capilar, durante um pequeno intervalo de tempo. Sob condições de fluxo laminar, o comprimento da zona, é então determinado pela equação de Hagen-Poiseuille, representada pela equação 18, e o volume injetado, cerca de nL, pela equação 19.

$$H_{inj,hd} = \frac{\Delta P r^2}{8\eta L} t_{inj} \quad (18)$$

$$vi = \frac{2,84 \times 10^{-8} h t d^4}{L} \quad (19)$$

Onde: $H_{inj,hd}$ é o comprimento de zona da injeção hidrodinâmica, (t_{inj}) é o tempo de injeção, η é a viscosidade da solução e (ΔP) é a diferença de pressão estabelecida entre as extremidades do capilar, (r) raio interno do capilar e (L) comprimento total do capilar, (vi) é o volume de amostra injetado (nL), (h) altura da injeção, (t) tempo de injeção e (d) é o diâmetro interno do capilar. Quando a injeção hidrodinâmica é feita por aplicação de pressão na entrada do capilar, ou vácuo na saída do capilar, a diferença de

pressão é conhecida. Quando a injeção é feita através de sifonagem, a diferença de pressão pode ser calculada pela equação 20.

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (20)$$

Onde: (Δh) é a diferença de altura entre o nível de solução nos dois reservatórios, (ρ) é a densidade da solução e (g) é a aceleração da gravidade.

Na introdução eletrocinética de amostra, um gradiente de potencial (V) é estabelecido no capilar, por um breve período. O comprimento da zona injetada ($H_{inj,ec}$) é determinado pela mobilidade aparente (μ_{ap}) do componente de maior mobilidade na amostra, e da mobilidade eletroosmótica (μ_{feo}) e do tempo de injeção (t_{inj}), considerando o comprimento total do capilar (L) como pode ser visto na equação 21, e o volume de injetado (v_i) nesta modalidade pode ser analisado com a equação 22.

$$H_{inj,ec} = (\mu_{feo} + \mu_{ap}) \frac{V}{L} t_{inj} \quad (21)$$

$$v_i = \frac{V \Pi c t r^2 (\mu_{ap} + \mu_{feo})}{L} \quad (22)$$

Onde: (V) é a voltagem aplicada, (c) a concentração da amostra, (t) é o tempo de injeção, (r) é o raio interno do capilar, (μ_{ap}) é a mobilidade aparente, (μ_{feo}) é a mobilidade do fluxo eletroosmótico, e (L) é o comprimento total da coluna.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta etapa do trabalho, faz-se necessário discutir o emprego da técnica da eletroforese capilar de zona, que está sendo utilizada com muita ênfase para a determinação de ácidos orgânicos em matrizes como amostras de sucos de frutas e gêneros alimentícios. Para isso, encontram-se a seguir alguns trabalhos publicados que mostram a aplicabilidade da CZE bem como a sua importância para as determinações de ácidos orgânicos em amostras de sucos de frutas e em gêneros alimentícios (WU et al., 1995; SCHIEWE et al., 1995; TREVASKIS et al., 1995; ARELLANO et al., 1997; CHOI et al., 1997; FUKUSHI et al., 1997; HORIE et al., 1998; SOGA et al., 1999; SAAVEDRA et al., 2000; CASTIÑEIRA et al., 2000; FUNG et al., 2001; CASTIÑEIRA et al., 2002; XU et al., 2002; FUNG et al., 2003; GALLI et al., 2004; VICKERS et al., 2007; MATO et al., 2007, TANG et al., 2007; SANTALAD et al., 2007 PERES et al., 2009).

Em 1995, SCHIEWE et al. propuseram um sistema CZE para análise de L – aa em menos de 8 min em amostras de sucos cítricos tal como laranja e tangerina e em formulação de fármacos. Os autores utilizaram um capilar de sílica fundida, com 515 mm de comprimento efetivo x 0,05 mm d.i. e detecção UV *on-column* em 200 nm. As amostras foram filtradas num papel de filtro e diluídas quando necessárias, sendo fundamental a adição da L–cisteína, como antioxidante. O sistema proposto permitiu a avaliação da redução do ácido ascórbico nas amostras estudadas com e sem adição da L–cisteína, num período de 6 horas. Assim, após 6 horas, foi possível avaliar que houve uma redução de 80% de sua concentração inicial. Foram encontrados 508-516 µg/mL (± 5 µg/mL) nas amostras dos sucos de

tangerina e 143-164 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 2 \mu\text{g/mL}$) nas amostras de sucos de laranja, com limite de detecção entre 1-4 $\mu\text{g/mL}$.

WU et al., 1995 discutiram a importância da combinação de eletrólitos de separação com inversores de fluxo eletrosmótico, a fim de se saber qual deles teria uma maior absorção considerando uma faixa de comprimento de onda (200 a 350 nm). Dessa forma, os autores constataram que a mistura do ácido trimetílico (TMA) como eletrólito de separação e brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) como inversor de fluxo eletrosmótico possibilitou o máximo de absorção em um comprimento de onda de 220 nm. Outro aspecto muito importante discutido neste trabalho foi em relação a mobilidade dos analitos em diferentes concentrações do TTAB, para isto estudou-se a mobilidade dos analitos em concentrações de 0,5 a 5 mmol/L do TTAB. A partir desse estudo, verificou-se que o uso do inversor acima de 2 mmol/L, ocasionava problemas de co-migração entre os ácidos tartárico, málico e succínico, portanto os melhores resultados foram obtidos utilizando 1 mmol/L do inversor. Outro ponto discutido foi para a escolha do pH, o qual foi testado com duas soluções tampão, uma com pH 5,5 e a outra com pH 9,0. A simetria no perfil do pico foi melhor quando usaram solução tampão com pH 9,0. Outro aspecto relevante, no que se refere a oxidação de ácidos orgânicos, é a facilidade que o L – aa tem de se oxidar, para avaliar a oxidação do L – aa, os autores prepararam uma solução padrão de L – aa a 0,1 mmol/L, e fizeram as seguintes observações: Após 48 horas de estocado no escuro houve uma redução de 45% no conteúdo do L – aa presentes na solução, após 3 horas de exposição da solução a luz a oxidação do L – aa foi de 80%. Diante das observações realizadas com os experimentos, a solução tampão continha 5 mmol/L de ácido trimetílico, 1 mmol/L do TTAB, pH 9,0, 20 kV, 20 μA , injeção hidrodinâmica por 3 s, 25 °C. Dois capilares de sílica fundida foram utilizados, um com 43 cm de comprimento total x 75 μm d.i x 365 μm diâmetro externo (36 cm efetivo) para a escolha da solução tampão, o outro para a separação dos analitos continha 70 cm de comprimento total x 75 μm d.i x 365 μm d.e. (63 cm efetivo) Os ácidos oxálico, cítrico, tartárico, acético, málico, succínico, láctico, carbônico, aspártico, glutâmico e ascórbico, foram identificados e

quantificados em amostras de bebidas, sucos industrializados e chás em menos de 10 min. As amostras foram preparadas a partir de uma simples filtração (0,2 µm) com posterior diluição.

A CZE também foi empregada por TREVASKIS et al., 1995, que separaram e quantificaram ácido oxálico, em amostras de beterraba, brócolis, cenoura e aipo. O ácido oxálico foi extraído com uma solução contendo 0,1 mol/L de ácido clorídrico a 60 °C ou com uma solução contendo 1,0 mol/L ácido clorídrico a 90 °C por 30 min. Os resultados foram comparados com outros dois métodos, a cromatografia líquida de alta eficiência e um método enzimático. Para o desenvolvimento deste método, utilizou-se um capilar de sílica fundida 75 µm diâmetro interno e 75 cm de comprimento total, sendo 50 cm efetivo, e detecção UV em 254 nm. As amostras foram injetadas no capilar a 20 KPa/s, com voltagem de 20 kV e 28 °C. A solução tampão continha 10% de metanol, 10 mmol/L tetrahidrato cromato de sódio e 4 mmol/L modificador de fluxo eletrosmótico. Os autores relataram que o uso do metanol foi fundamental na separação do ácido oxálico em presença do ânion nitrato. O coeficiente de variação foi de 2,7 a 4,9%, além disso, o método demonstrou boa linearidade dentro das faixas de trabalho consideradas, com coeficiente de correlação de 0,9994. Comparando-se os resultados obtidos, entre CZE e os outros dois métodos propostos, todos demonstraram semelhanças nos resultados, para realização das análises por CZE houve menor consumo de reagentes, menor custo e tempo de análise.

ARELLANO et al., 1996, determinaram ácidos orgânicos tais como o oxálico, tartárico e cítrico em amostras de vinhos branco, vermelho e em sucos maçã, por meio da eletroforese capilar de zona. Após otimização, o sistema empregou solução eletrolítica com 3 mmol/L 1,2,4,5-ácido tetracarboxílico benzoico (PMA), 3 mmol/L ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH= 7,5. Utilizou-se um capilar de sílica fundida de 45 cm de comprimento, sendo 7 cm de comprimento efetivo x 75 µm de diâmetro interno, detecção a 220 nm, voltagem de separação de 20 kV (7,4 µA). Os autores relataram que todos os ânions tiveram um menor tempo de análise ao utilizar 3 mmol/L de PMA, 20 kV, e temperatura constante em 30 °C. Para

condicionamento do capilar, utilizou-se hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L por 1 min, água 1 min, solução tampão por 2 min, a injeção foi hidrodinâmica por 2 s. O ácido tartárico foi encontrado somente nas amostras de vinho branco e vermelho. Para validação do método, avaliou-se a precisão que foi <0,54% (n=18), limite de detecção de 0,006 a 1,072 mg/L, limite de quantificação de 0,020 a 3,574 mg/L, o método foi linear de 0,1 a 100 mg/L, para os ânions em estudo, com coeficientes de correlação maior do que 0,99.

CHOI et al., 1997, analisaram o L – aa presente em chocolates, doces, biscoitos, alimentos balanceados, em vegetais, e sucos de frutas, como o suco de laranja, kiwi e maçã. Posteriormente, compararam os resultados com os resultados obtidos por cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) e por um método enzimático empregando o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). As condições eletroforéticas utilizadas foram: capilar de sílica fundida de 37 cm de comprimento total e 57 μ m de d.i., com tampão borato de sódio pH 8,0, comprimento de onda de 245 nm e campo elétrico de 556 V/cm. O tempo de análise foi de 2 min, com o coeficiente de variação que variou de 0,5 a 1,2%, e coeficiente de correlação de 0,9930 e recuperação entre 95 a 98,6%. A partir dos resultados obtidos, constatou-se que a CZE apresentou menor tempo de análise, cerca de 2 min enquanto que a HPLC gastou 15 min e o método enzimático (DNP) apresentou o maior tempo, cerca de 360 min. Concluiu-se que a CZE apresentou vantagens significativas em relação ao tempo necessário para a análise química, maior precisão em relação ao método enzimático DNP, e principalmente um menor custo por análise.

FUKUSHI et al., 1997 determinaram L –aa em amostras de vegetais tais como espinafre, nabo e salsa, utilizando eletroforese capilar de zona, em menos de 9 min, com detecção na região do UV ($\lambda = 270$ nm), 25 °C. Um volume de 12 nL de amostra foi injetada por 3 s, o capilar foi de sílica fundida com 72 cm de comprimento (50 cm efetivo) e 20 kV, 50 μ m d.i.x 375 d.e. Para a escolha do tamanho do capilar e da voltagem aplicada, analisou-se a eficiência do método, medidos em pratos teóricos de duas condições. Primeira: 15 kV, comprimento do capilar 54 cm (25 cm efetivo), segunda: 20

kV, comprimento do capilar 70 cm (50 cm efetivo). A segunda condição foi escolhida por apresentar um maior número de pratos teóricos (96000) em relação a primeira (83000). A solução tampão continha 20 mmol/L de tetraborato de sódio como eletrólito de separação, pH 9,2. Para a extração do L – aa, 2 gramas do vegetal em estudo foram homogeneizados com 4 mL de triuréia a 2%, e em seguida adicionaram-se 14 mL de ácido hidrocloreto a 10 mmol/L, ficando em repouso por 15 min, homogenizou-se a mistura e a centrifugou (3000 rpm) por 5 min. A suspensão era filtrada (0,45 µm) e injetada em seguida. O método proposto demonstrou ótimos valores de recuperação (97 a 104%).

O trabalho discutido por HORIE et al., 1998, determinou e quantificou os ácidos oxálico, cítrico, fluorídrico, málico, aspártico, glutâmico e cínico em chá verde e em chá preto, utilizando eletroforese capilar de zona, em menos de 6 min, com detecção no UV ($\lambda = 254$ nm) temperatura de 20 °C. Para preparação das amostras a serem analisadas, 3 gramas da folha foram fervidos com água (180 mL) por 3 min, e posterior filtração. Logo após, foram adicionados 0,25 mmol/L do ácido etilenodiaminotetraacético dissódico, para reduzir a influência de algum metal. O capilar foi de sílica fundida, com 57 cm de comprimento (360 µm diâmetro externo- x 75 µm d.i), as amostras eram injetadas por pressão durante 5 s e a voltagem de 20 kV. O pré-condicionamento do capilar era feito com a passagem constante de ácido hidrocloreto a 0,1 mol/L, hidróxido de sódio a 0,1 mol/L e a solução tampão que continha 10 mmol/L de cromato, como eletrólito de separação, 0,5 mmol/L brometo de tetradeciltrimetilamônio como inversor do fluxo eletroosmótico. Validou-se o método analisando o coeficiente de variação, o qual ficou entre 0,40 a 0,83% para o tempo de migração, e de 0,93 a 3,53% para a área do pico, o método foi linear na faixa de trabalho correspondente (0,2-1000 mg/L). A recuperação variou de 97 a 105% para o chá verde, e de 97 a 102% para o chá preto.

SOGA et al., 1999, demonstraram a separação simultânea de ácidos orgânicos, oxálico, fumárico, tartárico, málico, cítrico, acético e láctico, e de metais utilizando EDTA como agente complexante. O fluxo eletroosmótico foi invertido e empregou 2,6-ácido piridinodicarboxílico (PDC) como solução de

separação. Os ácidos e os complexos foram detectados por UV em amostras de banho de chaparia. Neste estudo, foram utilizados dois eletrólitos de separação, um contendo PDC com adição de EDTA, e outro contendo ftalato. Usando a primeira solução tampão, houve separação completa dos ácidos orgânicos em 15 min. Os melhores resultados, em termos de tempo de análise e perfil do pico, foram obtidos quando utilizou-se solução contendo 20 mmol/L de PDC com 0,5 mmol/L (CTAB) como inversor do fluxo eletroosmótico. A separação dos ácidos orgânicos foi estudada variando-se o pH da solução de separação de 3,6 a 6,4. Observou-se um aumento de mobilidade para todos os ácidos com o aumento do pH até 5,7, permanecendo constante até 6,5. O CV (n=6), para o tempo de migração variou de 0,12% a 0,16% e para a área do pico a variação foi de 1,1% a 3,9%. A curva de calibração foi linear para todos os analitos numa concentração de 10 a 100 mg/L, com valor mínimo de coeficiente de correlação de 0,9920, e o maior valor do limite de detecção foi 1,9 mg/L.

Em 2000, SAAVEDRA et al., propuseram um sistema eletroforético capilar de zona para determinação e quantificação de 4 ácidos orgânicos (isocítrico, málico, tartárico e cítrico) em sucos de laranja, dentre eles, os autores realçaram os ácidos tartárico e cítrico como sendo característicos dos sucos de laranja. Para a preparação da amostra, foi necessário uma filtração do líquido extraído da fruta, e filtrado em seguida com um filtro de 0,45 μm , e diluído com água destilada 1:1 (v/v). As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida com 57 cm de comprimento total, 50 μm de diâmetro interno, a detecção foi feita na região ultravioleta a 200 nm, a injeção foi feita no modo hidrodinâmico, com auxílio de pressão constante de 5 s, e a voltagem de separação foi de 14 kV. Para a escolha do tampão, fez-se um estudo utilizando 200 mmol/L do ácido fosfórico, com adição de hidróxido de sódio, num intervalo de pH de 3,0 a 8,0 ($\Delta=0,5$). As melhores respostas em termos de simetria de pico e precisão foram obtidas utilizando-se a solução tampão no pH 7,5. Segundo os parâmetros de validação, o método proposto mostrou-se linear nas faixas de trabalho consideradas, com coeficientes de correlação maior que 0,9900. Os testes de recuperação variaram de 97 a 104% para todos os analitos, e o

coeficiente de variação ficou entre 3,3 a 4,0%. Para avaliar a precisão do método proposto, os autores trabalharam com 24 soluções padrão, e analisaram 44 amostras de sucos de laranja obtidas num supermercado local. As quantidades dos ácidos orgânicos encontradas nos sucos de laranja foram: Ácido isocítrico de 0,3920 a 0,8380 g/100mL, ácido málico de 0,0008 a 0,0210 g/100mL, ácido tartárico de 0,1100 a 1,3400 g/100mL, ácido cítrico de 0,0650 a 0,1120 g/100mL, o limite de detecção variou de 0,002 a 0,009 g/L, para todos os ácidos.

CASTIÑEIRA et al., 2000, desenvolveu um método eletroforético de zona para identificar e quantificar ácido tartárico, málico, succínico, acético e láctico em amostras de vinhos, diluindo-os de 1:40 com água destilada, e filtrando as amostras em seguida com um filtro de 0,45 μm . O sistema ficou definido após a otimização da concentração do eletrólito de separação, pH e concentração do inversor do fluxo. As análises foram realizadas em um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total e 75 μm de diâmetro interno, comprimento de onda de 185 nm, 20 kV, injeção hidrodinâmica por 30 s. Para a escolha do eletrólito, analisou-se o perfil do pico de todos os ácidos orgânicos, nas seguintes condições: Primeira – 10 mmol/L do ácido bórico + 0,5 mmol/L de brometo de tetracetiltrimetilamonium (MTAB) em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s ($\lambda = 254$ nm), segunda – 10 mmol/L do ácido benzóico + 0,5 mmol/L de MTAB em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s e detecção a 185 nm; terceira – 10 mmol/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 0,5 mmol/L MTAB em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s e detecção a 185 nm; quarta – 10 mmol/L de ácido fitálico + 0,5 mmol/L MTAB em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s e detecção a 254 nm; quinta – 10 mmol/L de ácido sórbico + 0,5 mmol/L MTAB em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s e detecção a 214 nm. A partir desse estudo, escolheu-se a terceira condição (10 mmol/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 0,5 mmol/L de MTAB em pH de 6,0 a 6,5, voltagem de 20 kV, injeção hidrodinâmica por 20 s e detecção a 185 nm) por apresentar os melhores perfis de picos, eficiência na resolução e linha de base estável. Para a escolha do pH, trabalhou-se com o eletrólito

de separação $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ em $\lambda = 185$ nm, variando o pH de 5,5 a 7,0, sendo que os melhores resultados, em termos de simetria de pico, foram alcançados utilizando pH 6,5. Para a escolha da concentração do eletrólito de separação, estudou-se a mobilidade dos analitos em soluções eletrolíticas contendo de 3 a 10 mmol/L do $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. A partir dos resultados obtidos, percebeu-se que houve uma diminuição da mobilidade dos analitos e um aumento de tempo na análise à medida que aumentou a concentração do eletrólito de separação, por isso escolheu-se trabalhar com eletrólito de separação 3 mmol/L. O método proposto consumiu baixa quantidade de reagentes, com tempo máximo de análise de 6 min. A reprodutibilidade para área do pico foi de 0,40 a 0,96% (n=10), e para tempo de análise foi de 0,94 a 1,06% (n=10). O limite de detecção foi de 0,015 a 0,054 mg/L, e o limite de quantificação foi de 0,050 a 0,178 mg/L, a o método proposto mostrou-se linear para todos os analitos até 50 mg/L, com coeficiente de variação de 0,9993 a 0,9999.

Os trabalhos que analisaram ácidos orgânicos em sucos de frutas frescos ou em sucos industrializados, ou ainda em amostras de bebidas fermentadas, através da CZE, demonstraram muita facilidade na preparação das amostras a serem analisadas, eram somente filtração e diluição com água destilada, diferentemente das análises de ácidos orgânicos por CZE, realizadas em amostras de plantas ou em chás. O trabalho proposto por FUNG et al., 2001, deixou bem claro essa diferença, uma vez que os ácidos oxálico, tartárico e cítrico foram extraídos de plantas da tradicional medicina chinesa (*Flos chrysthemis*, *Spica prunellae* e *Folium mori*), da seguinte forma: As plantas foram secas a 40 °C por 24 h em forno, e armazenadas em um dessecador, a extração foi realizada com 0,1 mmol/L de hidróxido de sódio por 20 min, e filtradas posteriormente (0,2 μm). Outro aspecto muito interessante discutido em seu trabalho foi em relação a escolha da solução tampão. Os ácidos orgânicos de cadeia curta como o oxálico, tartárico e cítrico, é minoria em relação a outros ácidos de cadeia longa (presente em plantas) os quais possuem grandes semelhanças nas suas mobilidades, para diferenciar essas mobilidades estudou-se primeiro o efeito de vários aditivos para supressão do fluxo eletrosmótico, e o melhor resultado foi

quando usou 1,5 mmol/L tetraetilenopentamino (TEPA), com essa concentração alguns ácidos tiveram problemas de co-migração, os quais foram resolvidos ajustando o pH até 8,4, para melhorar ainda mais a diferença de mobilidade entre eles, utilizou-se solução tampão contendo 20% de metanol, portanto as melhores condições da solução tampão para separação e quantificação dos analitos foram: 3 mmol/L de 1,3,5-ácido benzenotricarboxílico (BTA), 15 mmol/L tris(hidroximetil)aminometano, 1,5 mmol/L tetraetilenopentamino pH 8,4, ajustado com hidróxido de lítio e 20% de metanol. O capilar foi de sílica fundida 65 cm de comprimento x 75 µm d.i., 18 kV de voltagem, corrente de 6 µA, injeção da amostra hidrodinâmica a 8 cm por 25 s e absorção dos analitos na região do UV (254 nm). O método apresentou bons resultados nos parâmetros de validação, sendo que o limite de detecção variou de 90 a 190 mg/g, a repetibilidade foi de 4,47 a 6,99%, n=4.

CASTIÑEIRA et al., 2002 discutiram sobre a determinação e quantificação de cinco ácidos orgânicos, tartárico, málico, acético, succínico, e láctico em amostras de vinho em menos 7 min, utilizando a eletroforese capilar de zona, com detecção na região do UV ($\lambda = 215$ nm), injeção da amostra por 30 s. As amostras foram preparadas a partir de uma simples filtração (0,45 µm) e posterior diluição, seguindo a proporção de 1:40 (vinho/água ultra pura). O capilar utilizado foi de sílica fundida com 60 cm de comprimento total (75 µm d.i), detecção *on-column*, com polaridade invertida. O condicionamento do capilar ocorreu com a passagem constante de NaOH a 0,1 mol/L durante 5 minutos, água ultra pura durante 10 min e a solução tampão por 10 min.

Fatores como pH, concentração do eletrólito de separação, e do inversor do fluxo eletroosmótico, foram fundamentais para a escolha da solução tampão. Empregaram-se duas soluções tampão, uma contendo fosfato e a outra ácido fitálico, da seguinte forma: Para a escolha do pH, estudaram-se as soluções numa faixa de pH de 5,5 a 7,0, sendo que os melhores resultados foi de 6,5 para a solução tampão que continha fosfato, e de 6,1 para a que continha ácido fitálico, para a escolha da concentração do eletrólito de separação, trabalhou-se com fosfato em concentrações de 3 a

10 mmol/L, e com ácido fitálico em concentrações de 5 a 10 mmol/L, as melhores respostas em termos de sensibilidade/tempo, se deu quando utilizaram-se 3 mmol/L para a solução contendo fosfato e 7 mmol/L para a solução contendo ácido fitálico. No que se refere a quantidade do inversor do fluxo eletrosmótico (MTAB), estudou sua concentração em 0,5 e 2,0 mmol/L, na solução que continha fosfato, enquanto que na solução que continha ácido fitálico, as concentrações do inversor foram de 0,5 e 3,0 mmol/L. Para o uso de metanol, estudou-se, em ambos os casos, a mobilidade dos ácidos, na presença de metanol até 20% (v/v). Os autores puderam perceber a diminuição da mobilidade de todos os ácidos orgânicos. Para a solução contendo fosfato, o uso de metanol não foi eficiente, uma vez que os analitos tiveram mobilidades muito próximas. Para a solução que continha o ácido fitálico, o uso de 5% de metanol favoreceu uma boa diferença de mobilidade entre todos os ácidos, logo as melhores condições das soluções tampão foram: Primeira solução tampão – continha 3 mmol/L fosfato como eletrólito de separação e 0,5 mmol/L (MTAB) como inversor do fluxo eletrosmótico, pH 6,5, tempo de análise menos de 6,5 min. Segunda solução tampão – continha 7 mmol/L de ácido fitálico como eletrólito de separação, 2 mmol/L de (MTAB) como inversor do fluxo eletrosmótico e 5% de metanol, para diminuir a mobilidade dos analitos, e pH 6,1 o qual possibilitou que os ácidos fossem analisados em 7,0 min. Tanto com o uso da primeira solução tampão, quanto da segunda, os ácidos apresentaram boa formação e simetria no perfil dos picos, porém, escolheu-se a primeira solução por apresentar uma maior sensibilidade. Validou-se o método proposto com análises de recuperação que ficou entre 98 a 107%, precisão para o tempo de migração (0,94 a 1,06%) e para a área do pico (0,40 a 0,96%), O limite de detecção foi de 0,015 e 0,054 mg/L.

XU et al., 2002, identificaram e quantificaram ácidos orgânicos como oxálico, tartárico, málico e cítrico em amostras de extratos de plantas, em menos de 6,5 min, utilizando um sistema eletroforético de zona, com detecção na região do UV ($\lambda = 190$ nm), capilar de sílica fundida com 75 cm de comprimento (70,4 cm efetivo x 50 μ m d.i.), injeção hidrodinâmica por 10 s, 25 °C, 20 kV de voltagem se separação, solução tampão contendo 30

mmol/L de fosfato de sódio como eletrólito de separação, 1 mmol/L de tetradeciltrimetilamônio como inversor do fluxo eletrosmótico e 20% (v/v) acetonitrila como solvente orgânico, pH 6,5. Os ácidos orgânicos foram obtidos a partir da extração com de 0,1 g da do extrato de planta com 5 mL de água destilada a 50 °C por 60 min, em seguida a solução era centrifugada e a suspensão filtrada em um filtro de membrana de 0,45 µm. O método proposto mostrou-se linear entre 0,01 a 1,00 mmol/L, dependendo do ácido estudado, o limite de detecção variou de 1,0 a 8,0 mmol/L, e o coeficiente de variação para a área do pico foi de 1,9 a 3,6%.

Alguns analitos possuem mobilidades idênticas, e esta característica é prejudicial na separação entre eles, porém, para diferenciar estas mobilidades pode-se utilizar um solvente orgânico. Os trabalhos propostos por WU et al., 1995 e FUNG et al., 2001, discutiram sobre a importância de se utilizar um solvente orgânico para diferenciar a mobilidade entre alguns analitos, para que migrassem em tempos distintos. Mais uma vez, FUNG et al., 2003, discutiram sobre essa importância, utilizando o tetraetilenopentamino (TEPA), como solvente orgânico, para evitar qualquer problema de co-migração entre os ácidos orgânicos em estudo. O método eletroforético de zona proposto, com polaridade e fluxo invertido, possibilitou a determinação de ácidos orgânicos tais como tartárico, cítrico, acético, láctico e ascórbico em sucos de laranja e em vinhos em menos de 14 min, com injeção de amostra em torno de nanolitros. As amostras foram obtidas a partir de uma simples filtração (0,45 µm) e posterior diluição de 1:50 (v/v). A solução tampão continha 3 mmol/L de 1,3,5-ácido benzenotricarboxílico (BTA), 15 mmol/L tris(hidroximetil)aminometano e 1,5 mmol/L tetraetilenopentamino (TEPA) pH 8,4, ajustado com hidróxido de lítio. O capilar foi de sílica fundida 65 cm de comprimento x 0,05 mm d.i., 25 kV de voltagem, corrente de 0,006 mA, injeção da amostra hidrodinâmica a 8 cm por 20 s e absorção dos analitos na região do UV (240 nm). O método proposto apresentou ótimos resultados de repetibilidade para o tempo de migração (0,27 a 0,67%, n=5), e boa precisão para a altura do pico (3,2 a 4,2%, n=5) e área (3,1 a 4,5%, n=5), os coeficientes de correlação foram

maiores do que 0,997, para uma faixa de trabalho de 0,005 a 2,000 mmol/L, O limite de detecção foi de 1 a 4 mmol/L.

O trabalho de GALLI et al., 2004, demonstra como a CZE vem se consolidando como técnica analítica para o controle de qualidade de ácidos orgânicos em frutos. Os autores propuseram a determinação de ácidos orgânicos em amostras de frutos do cafeeiro. Com o sistema proposto foram separados e determinados 17 ácidos orgânicos, dentre eles, o ácido oxálico e o cítrico, ambos extraídos do café em pó da seguinte forma: As amostras de café foram misturadas com água por 10 min e centrifugadas numa rotação de 2700 rpm por 5 min e filtradas num filtro de náilon com 0,22 μm . O estudo foi feito em amostras de café verde e café torrado. As condições eletroforéticas utilizadas foram as seguintes, 500 mmol/L de ácido bórico como eletrólito de separação pH 6,2, 0,5 mmol/L de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), capilar de sílica fundida de 57 cm de comprimento total e 50 μm de d.i., voltagem de separação foi de -10 kV (115 μA), injeção hidrodinâmica com pressão de 0,035 bar por 5 s, e detecção em 200 nm. A separação de todos os analitos ocorreu num tempo de 17,5 min, sendo que o ácido oxálico foi identificado em 8,5 min e o ácido cítrico em 11 min aproximadamente. Para validação da metodologia proposta, avaliaram-se as características analíticas tais como a linearidade, que variou de 0,050 a 8,000 mmol/L, a exatidão (recuperação), que ficou entre 92 a 101%, a precisão (CV) no mesmo dia 1,3 a 22,8% e em dias diferentes 2,0 a 29,3%, confirmando dessa forma bons resultados, quanto aos métodos de validação propostos.

A CZE também foi empregada por VICKERS et al., 2007, para análise de ácido tartárico em alimentos como: cacau, limonada, xarope de açúcar, bolo madeira e biscoitos. As amostras foram preparadas da seguinte forma: o cacau foi misturado a água destilada na proporção de 1:2 (m/v), até virar uma pasta e em seguida foram adicionados 100 mg/L do ácido tartárico, uma garrafa de limonada foi comprada e degaseificada com um banho ultrasom e adicionado 1 g do ácido tartárico a 11 g da limonada, permanecendo congelados até a análise, 600 g de açúcar foram misturados a 400 mL de água e adicionando-se 3,75 g do ácido tartárico, o bolo madeira e os

biscoitos foram preparados em laboratório, e avaliaram o percentual de ácido tartárico perdido durante o cozimento. As amostras a serem analisadas foram obtidas com a extração a partir de 5 g de cacau, bolo madeira, biscoitos e limonada, e 2 gramas do xarope de açúcar, as amostras foram colocadas em balões volumétricos de 100 mL e adicionados 80 mL de água destilada, ficando por 10 min em banho ultra-som, sendo posteriormente filtradas e analisadas. Para realização desse experimento, utilizou-se um sistema eletroforético, nas seguintes condições: polaridade e fluxo eletroosmótico invertidos, voltagem de 14 kV, a 22 °C, com absorção na região do ultravioleta ($\lambda = 214 \text{ nm}$). A injeção foi feita no modo hidrodinâmico numa pressão de 0,5 psi por 5 s. A solução tampão continha 200 mmol/L de fosfato pH 7,5 (preparada com ácido fosfórico e hidróxido de sódio). O capilar foi de sílica fundida 66 cm de comprimento total, sendo 56 efetivos e 50 μm de diâmetro interno. O condicionamento do capilar entre as injeções, ocorreu com injeção de água por 2 min, solução tampão por 2 min sob pressão de 20 psi, o ácido em estudo foi identificado e quantificado em menos de 12 min, em todas as amostras analisadas, o limite de detecção foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ e a recuperação ficou numa faixa entre 80 a 100%. Percebeu-se que houve perda de 20 e 14% do ácido tartárico nas amostras do bolo madeira e nos biscoitos, respectivamente, durante o processo de cozimento.

MATO et al., 2007, identificaram e determinaram o ácido tartárico e o cítrico em suco de uva, vinho branco, rosa e vermelho. As amostras dos sucos de uva e vinho foram diluídas com água destilada nas seguintes proporções: sucos de uva (0,3mL para 100mL), vinho (0,5mL para 100mL), em seguida filtradas em papel de filtro com 0,5 μm , e analisadas. Os autores trabalharam com duas amostras de sucos de uva, e seis amostras de vinho, sendo que nas amostras de vinho analisou-se duas de cada espécie, branco, rosa e vermelho. Todos os ácidos tiveram um tempo de migração menor do que 3 min. Para realização deste trabalho, empregou-se capilar de sílica fundida com 60 cm de comprimento total, sendo 52,5 cm de comprimento efetivo, e 75 μm de d.i., a detecção foi feita a 185 nm. A amostra foi introduzida no capilar de forma hidrodinâmica por gravidade, numa altura de 10 cm durante 30 s, e voltagem de 25 kV, a 25 °C, o tampão

constituía uma mistura contendo 7,5 mmol/L NaH_2PO_4 , 2,5 mmol/L Na_2HPO_4 como eletrólito de separação, junto a 2,5 mmol/L de TTAOH (hidróxido de tetradeciltrimetilamônio) como modificador do fluxo eletroosmótico e 0,24 mmol/L de CaCl_2 como modificador de seletividade e pH 6,40. O método proposto foi validado considerando o limite de detecção que variou de 0,05 a 0,38 mg/L, limite de quantificação variou de 0,29 a 1,31 mg/L, a precisão, avaliada com os resultados obtidos no mesmo dia, foi menor do que 3,69% (n=5), e entre dias diferentes foi <3,98% (n=3), a recuperação variou de 92,7 a 105,8%. As curvas de calibração foram montadas pelo método de calibração de padrão externo, sendo que os coeficientes de correlação foram maiores do que 0,9996.

O sistema proposto por TANG et al., 2007, identificou e determinou ácido cítrico, anísico, salicílico, benzóico e o L – aa, em amostras de molho de soja e vinagre, as amostras de vinagre foram preparadas com uma simples diluição com água destilada 1:10 (v/v), enquanto que as amostras de molho de soja foram misturados com tetracloreto de carbono (CCl_4) 1:3 (v/v) e centrifugados por 10 min, o extrato líquido foi descartado e a fase aquosa foi diluída com água destilada 1:10 (v/v). A solução de separação empregou 20 mmol/L de ácido bórico + 20 mmol/L de hidróxido de sódio como eletrólito de separação, 20 mmol/L de brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) como inversor do fluxo eletroosmótico e pH 8,8. Para a escolha da concentração do inversor do fluxo, e para a escolha do tipo de eletrólito utilizado nas diferentes proporções junto ao hidróxido de sódio, foram avaliados os seguintes parâmetros: o perfil do pico, o menor tempo de análise e a melhor resolução. Esses parâmetros foram avaliados a partir dos seguintes estudos: Variação da concentração do inversor do fluxo em 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mmol/L, mantendo-se constante em 20 kV a voltagem de separação, 8 s de injeção hidrodinâmica por gravidade com 8 cm de altura, e comprimento de onda em 240 nm. Para validação do método, avaliaram-se a linearidade, reprodutibilidade, limites de detecção e quantificação e a recuperação dos ácidos. Esse último variou de 98,2 a 99,2%, enquanto que o coeficiente de variação ficou numa faixa entre 2,60 a 2,97%, os quais demonstraram eficiência e exatidão na técnica aplicada.

SANTALAD et al., 2007, determinaram ácidos orgânicos tais como oxálico, tartárico, cítrico, entre outros, totalizando 11 ácidos, em amostras de sucos de frutas, vegetais e em vinhos por CZE em 12 minutos. Neste estudo, os autores empregaram solução tampão borato contendo 30 mmol/L pH 10,0 e 100 mmol/L de acetonitrila. Previamente as análises, as amostras receberam 2-nitrofenilhidrazina para derivatização dos ácidos orgânicos. Para separação, os autores empregaram 20 kV, injeção por 5 s a 0,5 psi e detecção em 230 nm. A amostra foi filtrada em 0,45 µm e diluída com água destilada antes das análises. A adição de acetonitrila a solução de separação aumentou o tempo de migração dos analitos e melhoria na resolução dos picos. Considerando as características analíticas do método proposto, o desvio padrão relativo foi < 4% pra o tempo de migração e <5% para a área do pico. Os coeficientes de correlação foram >0,999 e o limite de detecção variou de 2 a 10 mg/L e o de quantificação variou de 10 a 20 mg/L. As porcentagens de recuperação variaram entre 81,7 a 112,4%.

PERES et al., 2009, determinaram e quantificaram 6 ácidos orgânicos em 23 amostras de vinhos, produzidos e comercializados no Brasil, dentre eles o ácido tartárico e o ácido cítrico, os quais são fundamentais no processo de maturação, estabilidade microbiana, e em suas propriedades organolépticas. As análises foram realizadas com o uso de um capilar de sílica fundida, com 57 cm de comprimento, sendo que 50 cm efetivo, 75 µm de d.i. e 375 µm de d.e., a detecção dos analitos ocorreu na região do ultravioleta em 254 nm, todas as amostras foram diluídas com água destilada 1:5 (v/v), filtradas com um papel de filtro de 0,45 µm e analisadas em seguida. Para a escolha da solução tampão, testaram-se soluções que continham de 5 a 20 mmol/L do eletrólito de separação contendo ácido 3,5-dinitrobenzoico (DNB), ajustando o pH para 3,6 com ácido clorídrico (HCl), fixando a concentração do inversor do fluxo eletroosmótico (CTAB) em 0,2 mmol/L. De acordo com o perfil de pico, e boa formação de linha de base, utilizou-se nas análises uma solução tampão que continha 10 mmol/L ácido 3,5-dinitrobenzoico (DNB) pH 3,6 e 0,2 mmol/L de CTAB. Para validação do método proposto, estudou-se a linearidade, que ficou numa faixa de 6 a 285 mg/L com coeficiente de correlação maior 0,9901, limite de detecção de 0,64

a 1,65 mg/L, limite de quantificação de 2,12 a 5,15 mg/L, o tempo de migração para todos os ácidos foi menor que 5,5 min, sendo que o tempo de migração do ácido tartárico foi < 3 min e para o ácido cítrico foi <5 min. O coeficiente de variação ficou variou de 0,1 a 3,95% (n=3) e as recuperações variaram entre 95 a 102%, as amostras analisadas mostraram uma grande variação entre as quantidades de ácidos orgânicos, principalmente do ácido tartárico, 1023 a 2212 mg/L. Os autores determinaram, em apenas uma amostra, uma quantidade superior a 1 g/L de ácido acético. Uma quantidade tão alta evidencia adulteração do vinho.

Percebeu-se que para análise de ácidos orgânicos em sucos de frutas frescos, ou sucos de frutas industrializados por ECZ, a matriz foi obtida a partir de uma simples extração com posterior diluição, tem-se na Tabela 3, resumos com essas análises. Além do método eletroforético, metodologias de CLAE foram publicadas e podem ser encontradas na literatura para a determinação simultânea de ácidos orgânicos nos sucos de frutas e em gêneros alimentícios (HERNÁNDEZ et al., 2006; VIGNOLI et al., 2007; SCHERER et al., 2008; QUIRÓS et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2009). Para essas análises, as amostras foram preparadas extraíndo inicialmente os ácidos com água, etanol ou outro solvente orgânico, com posterior diluição e filtração. Resumo de trabalhos discutindo essas análises são mostrados na Tabela 4.

Tabela 3 – Estudos para a determinação dos principais ácidos orgânicos em sucos de frutas e gêneros alimentícios utilizando eletroforese capilar de zona BGE – Eletrólito de separação.

Ácidos	Matriz	BGE/Tempo de análise	Referências
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10	alimentos e bebidas	5 mmol/L trimetilato 1 mmol/L de (TTAB) pH 9,0 / 10 min	WU et al., 1995
5	sucos de frutas nativas, bebidas de frutas e formulações farmacêuticas	20 mmol/L tampão fosfato pH 8,0 / 8 min	SCHIEWE et al., 1995
1	beterraba, brócolis, cenoura e aipo	10 mmol/L cromato de sódio, 4 mmol/L anion-BT, 10 % metanol pH 8,0 / 5 min	TREVASKS et al., 1995
1, 2, 3, 4, 6	alimentos e amostras de bebidas	3 mmol/L PMA – 3 mmol/L DETA pH 7,5 / 11 min	ARELLAN, et al., 1997
5	vegetais como espinafre, nabo e salsa	20 mmol/L tetraborato de sódio pH 9,2 / menos de 5 min	FUKUSHI et al., 1997
5	vegetais, sucos de frutas e drinques	Tampão borato de sódio pH 8,0 / 2 min	CHOI et al., 1997
1, 3, 6, 9	chá	10 mmol/L de cromato, 0,5 mmol/L (TTAB) e 0,1 (EDTA) em ajuste do pH / 5,5 min	HORIE et al., 1998
1, 2, 3, 4, 6, 8	amostras de banho de chaparia	20 mmol/L de PDC com 0,5 mmol/L (CTAB) pH 6,5 / 15 min.	SOGA et al., 1999
2, 4, 6, 8	vinho	3 mmol/L fosfato, 0,5 mmol/L MTAB pH 6,5 / 6 min	CASTIÑEIRA, et al., 2000
2, 3, 6	suco de laranja	200 mmol/L fosfato pH 7,5 / 11 min	SAAVEDRA, et al., 2000
1, 2, 3, 6	sucos de maçã, uva, pêra e laranja	15 mmol/L fosfato, 0,4 mmol/L brometo de cetilpiridina (CPB) 20 mmol/L β -ciclodextrina / 7,5 min	YANG et al., 2000

1, 2, 3, 8	plantas medicinais	15 mmol/L tris(hidoximetil)aminometano, 3 mmol/L ácido 1,2,3- benzenotricarboxílico 1,5 mmol/L (TEPA) tetraetilenopentamino, 20% de metanol, pH 8,4 / < 20 min	FUNG et al., 2001
1, 2, 6	sucos de uva	180 mmol/L fosfato 1 mmol/L de (CTAB) 15 % (v/v) metanol pH 7,2 / 7 min	VORARAT et al., 2002
2, 4, 6, 8	vinhos	3 mmol/L fosfato e 7 mmol/L de ácido fitálico pH 6,1 / 6 min	CASTIÑEIRA et al., 2002,
3, 4, 5, 6, 8	vinho branco, vinho vermelho e suco de laranja	3 mmol/L ácido 1,2,3- benzenotricarboxílico, 15 mmol/L tris(hidoximetil)aminometano, 1,5 mmol/L (TEPA) tetraetilenopentamino, pH 8,4 / menos de 14 min	FUNG et al., 2003
2, 3, 4, 6, 7	café	500 mmol/L tampão fosfato. 0,5 mmol/L CTAB pH 6,25 / 18 min	GALLI et al., 2004
5	suco de uva	60 mmol/L tampão borato, pH 9,0 / 18 min	WU et al., 2007
1, 3, 4, 6, 7	extratos de plantas	0,01 mmol/L trimetilato, 0,0003 mol/L TTAB pH 9,0 / 2 min	RIVASSEAU et al., 2006
2, 3, 4, 6	suco de uva e vinho	7,5 mmol/L NaH ₂ PO ₄ ; 2,5 mmol/L NaH ₂ PO ₄ , 2,5 mmol/L OFM-OH; 0,24 mmol/L CaCl ₂ pH 6,4/3,5 min	MATO et al., 2007
2	cacau, limonada, xarope de açúcar, bolo madeira e biscoitos	200 mmol/L tampão Na ₂ HPO ₄ pH 7,5 / 12 min	VICKERS et al., 2007
11, 12, 13, 14	molho de soja e vinagre	20 mmol/L NaOH 20 mmol/L H ₃ BO ₃ pH 8,8 / 5 min	TANG al., 2007
2, 3, 4, 6, 8	vinho	10 mmol/L 3,5-ácido dinitrobenzóico (DNB) 0,2 mmol/L CTAB pH 3,6 / 5 min	PERES et al., 2009

Dados: Ácido 1-oxálico, 2-tartárico, 3-cítrico, 4-acético, 5-L – aa, 6-málico, 7-fórmico, 8-láctico, 9-aspártico, 10-glutâmico, 11-salicílico, 12-benzóico, 13-anísico, 14-sórbico.

Tabela 4 – Estudos para a determinação dos principais ácidos orgânicos em sucos de frutas e gêneros alimentícios utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Ácido Orgânico	Matriz	Preparação da amostra	Mecanismo de separação/ nº de Coluna /Detecção/tempo de análise	Referência
2, 3, 4, 6, 7, 8	vinho	Diluição filtração	Exclusão de íon/1/ eletroquímica/15min	CASELA et al.,2002
2, 3, 8	suco de uva	Precipitação filtração	Exclusão de íon/1/ espectrofotometria UV/Vis/11min	SOYER et al., 2003
1, 2, 3, 8, 6	vinho	Diluição filtração	Fase-reversa/ 1/indução fotoquímica e quiluminescência /30 min	PEREZ-RUIZ et al., 2004
9, 10	gêneros alimentícios	Extração filtração	Fase reversa/1/ espectrofotometria UV/Vis/23 min	SAAD et al., 2005
5	banana, mamão, manga e abacaxi	Extração Centrifugação filtração	Isocrática/1/ espectrofotometria UV/Vis/ 9 min	HERNÁNDEZ et al., 2006
2, 3, 4, 6	café solúvel	Dissolução filtração	Fase reversa /1/espectrofotometria UV/Vis/70 min	VIGNOLI et al.,2007
2, 3, 6, 5	acerola, açaí, polpas de caju	Diluição filtração	Isocrática/1/ espectrofotometria UV/Vis/7 min	SCHERE et al.,2008
2, 3	tomates	Extração centrifugação diluição/filtração	Gradiente /1/espectrofotometria UV/Vis/ 12 min	SUÁREZ et al.,2008
1, 2, 3, 6	mamão, abacaxi	Extração centrifugação filtração	Isocrática/1/ espectrofotometria UV/Vis/ mais de 60 min	HERNÁNDEZ et al., 2009
5	laranja, maçã, abacaxi, refrigerantes de laranja, limão, chá, isotônicos e de cola	Filtração diluição	Fase reversa /2/espectrofotometria UV/Vis/6 min	QUIRÓS et al.,2009
3, 6, 5	sucos e vinhos de laranja	Diluição filtração	Fase isocrática e por gradiente/1/ espectrofotometria UV/Vis/20 min	KELEBEK et al.,2009

Dados: Ácido 1-oxálico, 2-tartárico, 3-cítrico, 4-acético, 5-L – aa, 6-málico, 7-fórmico, 8-láctico, 9-benzoico, 10-sórbico.

6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema eletroforético usado nas análises foi um sistema caseiro constituído de:

- CE Linear Instruments model 200 detector user manual (San Jose, CA) (equipado com detector UV-Vis, fonte de alta voltagem CZE 100R (Spellman modelo CZE 30PN1000); Estação eletroforética (Data Apex Ltda, USA) acoplada a um microcomputador; Bomba peristáltica com 13 canais Ismatec modelo mp 13GJ-4; Capilar de sílica fundida (Polymicro) com diâmetro interno 75 μm e externo de 375 μm , comprimento total 59 cm sendo 23,4 de comprimento efetivo sem recobrimento interno; frascos com solução de eletrólito, eletrodos de platina do pólo positivo e negativo, suportes de madeira.

Outros aparelhos e equipamentos também foram utilizados, tais como:

- Balança analítica BEL engineering mark 210^a classe I;
- Medidor de pH Marconi PA 200;
- Destilador CIENTEC;
- Balão volumétrico (100 mL), vidro de relógio, béquer espátula, proveta graduada (5, 10, 15, 20 mL) bastão de vidro, garra, suporte, papel de filtro qualy 0,45 μm , funil de vidro.

6.2. SOLUÇÕES E REAGENTES

A limpeza das vidrarias do laboratório foi feita com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L e água destilada. Para limpeza do capilar foram empregadas soluções 1 mol/L HCl e 0,1 mol/L NaOH. Outros reagentes foram: ácido bórico (H_3BO_3) PA (Baker, Brasil), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Vetec, Alemanha), ácido oxálico PA (Vetec, Alemanha), ácido tartárico PA (Vetec, Alemanha) ácido cítrico anidro PA (Labsynth, Brasil), ácido gálico (Vetec, Alemanha), ácido ascórbico (F. Maia Indústria e Comércio LTDA, Brasil), hidróxido de sódio (Merck, Alemanha), ácido clorídrico PA (ISOTAR, Brasil), metanol (JJ Baker, Brasil) e água destilada.

A solução tampão, e as soluções padrão dos ácidos, eram preparadas diariamente antes do seu uso, em alíquotas de 100 mL, e descartadas ao final do dia.

As soluções de trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações:

- Ácido bórico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 mmol/L);
- Brometo de cetiltrimetilamônio 0,5 mmol/L (CTAB);
- Soluções padrão de ácido oxálico, tartárico, cítrico e L – aa 0,4000 g/100mL, ácido gálico 0,2000 g/100mL;
- As soluções dos ácidos orgânicos utilizadas no preparo das curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição das soluções padrão nas respectivas proporções: ácido oxálico e L – aa 0,0150 g/100 mL, tartárico e cítrico 0,0250 g/100 mL e o gálico 0,0060 g/100mL;
- Solução do branco (100 mmol/L de ácido bórico + 0,5 mmol/L brometo de cetiltrimetilamônio, pH 10,0 ajustado com hidróxido de sódio a 0,1 mol/L e ácido clorídrico a 1 mol/L;
- Solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L;
- Solução de ácido clorídrico a 1 mol/L.

6.3. ESTUDO DAS AMOSTRAS

6.3.1. AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

O limão e a laranja foram adquiridos em um sítio no povoado Taperinha dos Gatos Lagarto/SE. A acerola, caju, umbu-cajá e a carambola foram comprados no mesmo local e dia no supermercado de Aracaju/SE, o morango e a uva no mercado de Itabaiana. Os sucos industrializados foram adquiridos em dois supermercados de Aracaju/SE, com o prazo de validade vigente.

6.3.2. PREPARAÇÃO, DILUIÇÃO, TEMPO, TEMPERATURA DE ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS E NÚMERO DE ANÁLISE

As amostras dos sucos frescos foram preparadas extraindo o suco espremendo a fruta diretamente sobre o papel de filtro de 0,45 µm (Qualy), diluídos posteriormente com água destilada nas proporções que variaram de 1:5 no suco de Caju (*Anacardium Occidentale*) a 1:50 no suco de limão (*Citrus Limonum*), permitindo que os resultados ficassem nas faixas de trabalho estudadas. A temperatura de estocagem das frutas variou de 0 °C a 23 °C, com o intuito de se avaliar o comportamento dos ácidos em temperaturas distintas, e o seu tempo de estudo correspondia ao tempo que começava a sua degradação. Durante o estudo, o ácido cítrico foi analisado 20 vezes na laranja (*Citrus Sinensis*), 9 no umbu cajá (*Spondias Cytherea*), 3 no morango (*Fragaria Vesca*) e 17 no limão (*Citrus Limonum*), o L – aa foi analisado 18 vezes no caju (*Anacardium Occidentale*), 20 na laranja (*Citrus Sinensis*), 3 no morango (*Fragaria Vesca*) e 9 na acerola (*Malpighia Globra*), o ácido oxálico foi analisado 9 vezes na carambola (*Averrhoa Carambola*) e o ácido tartárico 12 vezes na uva (*Vitis Vinefera*) e 9 na carambola (*Averrhoa Carambola*), Tabela 5.

As amostras de sucos industrializados eram obtidas filtrando o suco diretamente no papel de filtro de 0,45 µm (Qualy), diluídos posteriormente com água destilada na proporção 1:5. Essas diluições permitiram que os

resultados ficassem dentro das faixas de trabalho estudadas. Os sucos industrializados foram armazenados a 23 °C, e o tempo de análise variou de 42 dias no suco misto de laranja limão e tangerina a 56 dias no suco de goiaba como mostrado, onde o ácido cítrico foi analisado 9 vezes no suco misto de maçã, limão, uva e no suco de goiaba, 6 vezes no suco misto de laranja limão e tangerina, o L – aa foi analisado 12 vezes nos suco misto de maçã, tangerina, laranja, limão e no suco misto de acerola , laranja enriquecido com L – aa, Tabela 6.

Tabela 5 – Diluição, condições e tempo de armazenamento das amostras de sucos de frutas frescos.

Fruta	Diluição (v/v)	Temperatura (°C) estocagem	Dias estocados	(Ácido orgânico) Número de análises
Caju	1:5	0	28	(5) 18
Laranja	1:10	23	34	(3 e 5) 20
Uva	1:10	0	28	(2) 12
carambola	1:15	0	15	(1 e 2) 9
Umbu cajá	1:15	0	15	(3) 9
Morango	1:20	23	-	(3 e 5) 3
Acerola	1:25	0	45	(5) 9
Limão	1:50	23	30	(3) 17

Ácidos: 1 – oxálico, 2 – tartárico, 3 – cítrico, 4 – gálico, 5 – L – aa.

Tabela 6 – Diluição, condições e tempo de armazenamento das amostras de sucos industrializados.

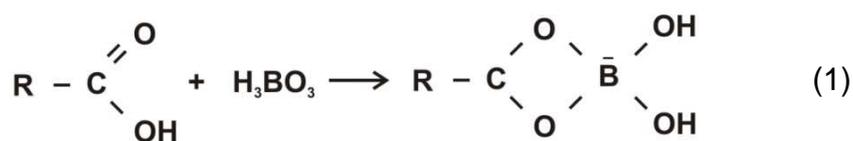
Suco	Diluição (v/v)	Temperatura (°C) estocagem	Dias estocados	(Ácido orgânico) Número de análises
A	1:5	23	54	(5) 12
B	1:5	23	54	(5) 12
C	1:5	23	42	(3) 6
D	1:5	23	56	(3) 9
E	1:5	23	44	(3) 9

Ácidos: 3 – cítrico, 5 – L – a, A – misto de acerola, laranja, enriquecido com L – aa; B – misto de maçã, tangerina, laranja e limão; C – misto de laranja, limão e tangerina; D – goiaba; E – misto de maçã, limão e uva.

6.4. CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS

6.4.1. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

Neste trabalho, utilizou-se a eletroforese capilar de zona, com inversão do fluxo eletroosmótico e da polaridade. Assim, o fluxo eletroosmótico ocorre do cátodo (-) ao ânodo (+), diferentemente de como ocorre no fluxo eletroosmótico normal. A injeção foi feita no pólo negativo (cátodo), inversamente a polaridade normal. Deste modo, foi possível otimizar a separação dos ânions. A solução de ácido bórico pH 10,0 foi empregada como eletrólito de separação, possibilitando a formação dos complexos aniônicos, conforme reação 1.



Ácido carboxílico ácido bórico complexo formado

Antes das análises, o capilar foi condicionado bombeando-se HCl a 1 mol/L por 5 min, H₂O por 5 min, NaOH 0,1 mol/L por 10 min e 30 min da solução tampão contendo 100 mmol/L H₃BO₃ + 0,5 mmol/L do CTAB pH 10,0. Para fechar o circuito elétrico, as extremidades do capilar foram mergulhadas em dois frascos (2mL) contendo a mesma solução tampão de 100 mmol/L H₃BO₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L do CTAB. A voltagem a 8 kV foi ligada durante cinco minutos para a eletroestabilização, em seguida foi feita uma corrida empregando apenas a solução tampão (branco), e posterior introdução da amostra no capilar por gravidade numa altura de 4,5 cm. Os analitos foram detectados *on column* (Figura 6) utilizando um detector UV. O comprimento de onda utilizado foi de 214 nm, devido a absorção dos ácidos orgânicos na faixa de 200-240 nm (KLAMPFL, C.W., 2007). Os sinais foram monitorados empregando a estação eletroforética Data Apex Ltda, USA. A temperatura para a realização das análises foi mantida em 23 °C. As

injeções foram feitas elevando a extremidade do capilar em contato com a solução tampão, onde encontrava o eletrodo de platina (pólo negativo) a uma altura de 4,5 cm por 30 s. Os suportes de madeira foram usados para acomodar os frascos que continham a solução eletrolítica. A montagem desse sistema permitiu avaliar os principais parâmetros envolvidos na separação dos ácidos orgânicos.

6.4.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO

A concentração do eletrólito foi avaliada mantendo-se constantes, o capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μm e externo de 375 μm , comprimento total de 59 cm (23,4 cm efetivo), a temperatura ambiente foi de 23 $^{\circ}\text{C}$, e a solução de separação continha 0,5 mmol/L do CTAB.

Para cada solução preparada, variou-se a voltagem de 2 em 2 kV, anotando-se o sinal da corrente correspondente (em μA). Posteriormente, foram obtidos os gráficos I x V para cada solução.

A partir dos resultados obtidos no estudo anterior, a voltagem foi mantida em 8 kV, neste modo, a corrente foi de 36 μA . A detecção dos ácidos foi feita em 214 nm, inversão do fluxo eletroosmótico com 0,5 mmol/L CTAB, inversão da polaridade, tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade de 15 s a 4,5 cm de altura, a concentração do eletrólito de separação foi avaliada em 100, 150 e 200 mmol/L.

6.4.3. INFLUÊNCIA DO pH DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO NO PERFIL DO PICO

O estudo do pH foi realizado mantendo-se constantes: voltagem de separação em 8 kV, corrente de 36 μA , detector em 214 nm, e a solução de ácido bórico 100 mmol/L + 0,5 mmol/L CTAB, polaridade invertida, tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade de 15 s, a temperatura de 23 $^{\circ}\text{C}$, o pH da solução foi variado em 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0.

6.4.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INJEÇÃO SOBRE O PERFIL DO PICO

O estudo do tempo de injeção foi realizado mantendo-se constantes: voltagem de separação em 8 kV, corrente de 36 μ A, detector em 214 nm, e a solução de ácido bórico 100 mmol/L + 0,5 mmol/L CTAB pH = 10,0 , polaridade invertida, injeção hidrodinâmica por gravidade, temperatura de 23 °C, o tempo de injeção foi variado em 3, 15, 30 e 45 s.

6.4.5. USO DE METANOL NA SOLUÇÃO DE SEPARAÇÃO

O estudo do uso de metanol como solvente orgânico, foi realizado mantendo-se constantes: voltagem de separação em 8 kV, corrente de 36 μ A, detector em 214 nm, e a solução de ácido bórico 100 mmol/L + 0,5 mmol/L CTAB pH= 10,0, polaridade invertida, tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade 15 s (4,5 cm de altura), a temperatura de 23 °C. A influência do metanol na solução de separação foi avaliada preparando-se soluções contendo 5% e 20% (v/v) de metanol.

6.4.6. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS ESTUDADOS

A identificação dos picos foi obtida a partir das soluções preparadas em soluções mistas. As condições foram mantidas em: voltagem de separação em 8 kV, corrente de 36 μ A, detector em 214 nm, e a solução de ácido bórico 100 mmol/L + 0,5 mmol/L CTAB pH = 10,0, polaridade invertida, tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade 15 s (4,5 cm de altura), temperatura de 23 °C, a solução mista continha: ácido oxálico e L – aa 0,0150 g/100mL, ácido tartárico e cítrico 0,0250 g/100mL, ácido gálico 0,0060 g/100mL.

6.4.7. CURVAS ANALÍTICAS DOS ÁCIDOS ESTUDADOS E CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO PROPOSTO

Uma vez identificados os picos referentes aos ácidos orgânicos estudados, obtiveram-se 7 curvas analíticas a partir da concentração x altura do pico da seguinte forma:

- 1- ácido oxálico na presença do ácido tartárico;
- 2- ácido tartárico na presença do ácido oxálico;
- 3- ácido tartárico na ausência dos outros;
- 4- ácido cítrico na ausência dos outros;
- 5- ácido cítrico na presença do L – aa;
- 6- L – aa na presença do ácido cítrico;
- 7- L – aa na ausência dos outros.

As condições foram mantidas em: voltagem de separação em 8 kV, corrente de 36 μ A, detector em 214 nm, solução de ácido bórico 100 mmol/L + 0,5 mmol/L CTAB pH=10,0, polaridade invertida, tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade 15 s (4,5 cm de altura) e temperatura de 23 °C.

6.4.8. VALIDAÇÃO

As sete curvas analíticas foram obtidas a partir das seguintes misturas: curva do ácido oxálico, na presença do ácido tartárico (0,0120, 0,0160, 0,0120, 0,0240 e 0,0280 g/100 mL do oxálico, fixando o tartárico em 0,0160 g/100 mL); Curva do ácido tartárico, na presença do ácido oxálico (0,0120, 0,0160, 0,0200, 0,0240 e 0,0280 g/100mL do tartárico, fixando o oxálico em 0,0160 g/100mL); Curva do ácido tartárico na ausência dos outros (0,0100, 0,0150, 0,0200, 0,0250 e 0,0300 g/100mL); Curva do ácido cítrico na ausência dos outros (0,020, 0,025, 0,0300, 0,0350 e 0,0400 g/100 mL); Curva do ácido cítrico na presença do L – aa (0,020, 0,0250, 0,0300, 0,0350 e 0,0400 g/100mL do cítrico, fixando a concentração do L – aa em 0,0200 g/100 mL); Curva do L – aa,na presença do ácido cítrico (0,0150, 0,0200, 0,0250, 0,0300 e 0,0350 g/100mL do L – aa, fixando o cítrico em

0,0350 g/100 mL); Curva do L – aa na ausência dos outros (0,0100, 0,0200, 0,0300, 0,0400, 0,0500 g/100mL).

A linearidade e faixa de trabalho foram obtidos a partir da análise das curvas analíticas, sendo que cada ponto da curva foi gerado com análise em triplicata.

A sensibilidade foi avaliada por meio dos coeficientes angulares, obtidos nas curvas de calibração.

A precisão de um método está relacionada com a concordância das medidas entre si, ou seja, quanto maior a dispersão dos valores, menor a precisão. Esta variável pode ser expressa de várias maneiras, mas diz-se que quanto maior a grandeza dos desvios, menor a sua precisão (BACCAN et al., 1998). Para determinar a precisão de um conjunto de dados, pode-se calcular o desvio dos valores em relação a sua média aritmética, ou seja, a estimativa do desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) dado pela equação 23 (HARRIS, 2008). Onde X_m é a média aritmética das medidas e s a estimativa do desvio padrão, dado pela equação 24, onde X_i representa cada valor unitário, e n corresponde ao número de valores (HARRIS, 2008). A precisão foi calculada usando o coeficiente de variação, em três níveis de concentração, 0,0100, 0,0150 e 0,0200 g/100mL, empregando a equação 23.

$$CV = \frac{s \cdot 100\%}{x_m} \quad (23)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n - 1}} \quad (24)$$

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da medida de 10 pontos na linha base do branco, conforme equações, 25 e 26.

$$LD = \frac{3S}{m} \quad (25)$$

$$LQ = \frac{10S}{m} \quad (26)$$

A repetibilidade foi testada (n=5) injetando-se a amostra de suco de laranja e limão, no mesmo dia e dias diferentes.

O estudo de recuperação foi efetuado a partir da análise das amostras, com adição de padrão nas mesmas, calculadas com a equação 27.

$$R = \frac{\Delta C}{C_i} (100) \quad (27)$$

Onde: R é a recuperação, ΔC é a diferença de concentração (concentração final menos a concentração inicial, Cf-Ci).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO

Visto que a voltagem é um importante parâmetro na separação em análises eletroforéticas, os trabalhos iniciais enfocaram o estudo da voltagem a ser utilizada nas análises. Para isto, estudou-se o aumento do sinal de corrente em relação ao aumento da voltagem aplicada, lei de Ohm, em 12 soluções com concentrações entre 10 e 200 mmol/L, fixando o pH em 10,0. Pode-se observar que o aumento da voltagem do sistema promoveu aumento do sinal de corrente, e que este aumento, dependendo da concentração de eletrólito de separação, manteve a linearidade até um valor máximo de voltagem, Figura 10.

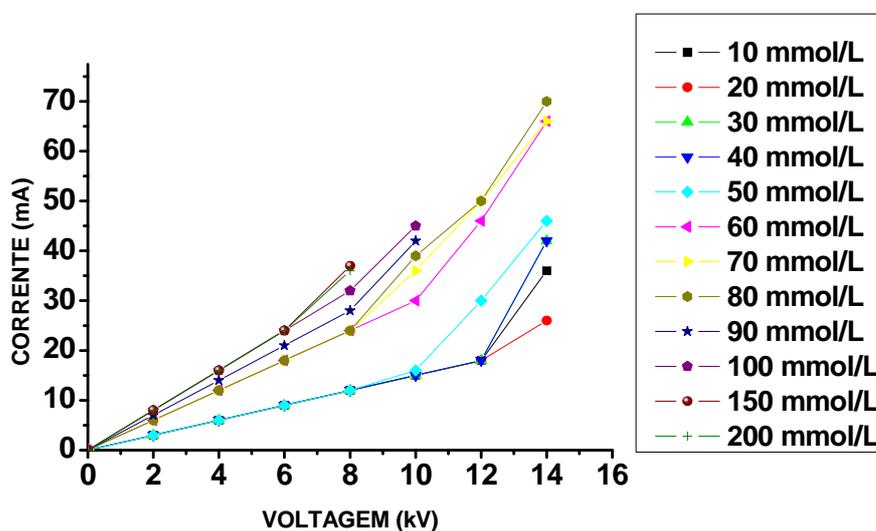


Figura 10 – Lei de Ohm. Variação da voltagem e da corrente do sistema em função do aumento da concentração da solução. Condições experimentais: H_3BO_3 pH= 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB.

O valor máximo foi mantido em todas as separações, visando a otimização do método. Ao utilizar um tampão com 10 mmol/L de eletrólito de separação em pH 10,0, a linearidade se estendeu até 12 kV e a corrente de 16 μ A, quando se usou uma solução tampão com 200 mmol/L em pH 10,0, a linearidade se estendeu até 6 kV e 26 μ A. Dessa forma, tanto para soluções tampão com baixas ou altas concentrações de eletrólito de separação, é necessário investigar o máximo de voltagem que pode ser aplicada. Portanto, escolheu-se uma solução tampão que continha 100 mmol/L do eletrólito de separação, uma vez que baixas concentrações, menor que 5 mmol/L, podem reter analitos ou parte deles na parede interna do capilar, prejudicando a precisão do tempo migração, e ainda, altas concentrações de eletrólito de separação, acima de 200 mmol/L, poderia produzir um superaquecimento interno no capilar (efeito Joule), prejudicando, a separação dos analitos.(LANDERS, 1997).

Verificou-se a influência da concentração do eletrólito de separação, utilizando uma solução de ácido cítrico a 0,3 g/100mL. A partir desse estudo, verificou-se que a concentração do eletrólito de separação influencia diretamente o perfil do pico e o tempo de migração do analito. Pode-se observar que quanto maior a concentração do eletrólito de separação, maior a área e/ou altura do pico para um analito de mesma concentração (Figura 11). O tempo de migração do analito aumentou quando a concentração do eletrólito passou de 100 para 150 mmol/L. Este aumento de tempo ocorreu devido à alteração do potencial zeta (ζ) formado a partir da interação de duas camadas carregadas positivamente na parede interna do capilar, sendo que uma delas é denominada camada fixa e a outra camada móvel, e entre elas forma-se o potencial, que é o responsável pela criação do fluxo eletrosmótico (FEO), que transporta os analitos do pólo positivo ao pólo negativo. No modo normal de eletroforese, a velocidade de migração depende do número de cargas positivas que se formam nessas camadas. Portanto, quanto maior o número de cargas na parede interna do capilar maior é o potencial zeta (ζ), e maior será a mobilidade do fluxo eletrosmótico. Por outro lado, aumentando-se significativamente a concentração ou força iônica da solução, a diferença de potencial diminui,

diminuindo a mobilidade do fluxo eletroosmótico, aumentando o tempo de análise (ALTRIA, 1996).

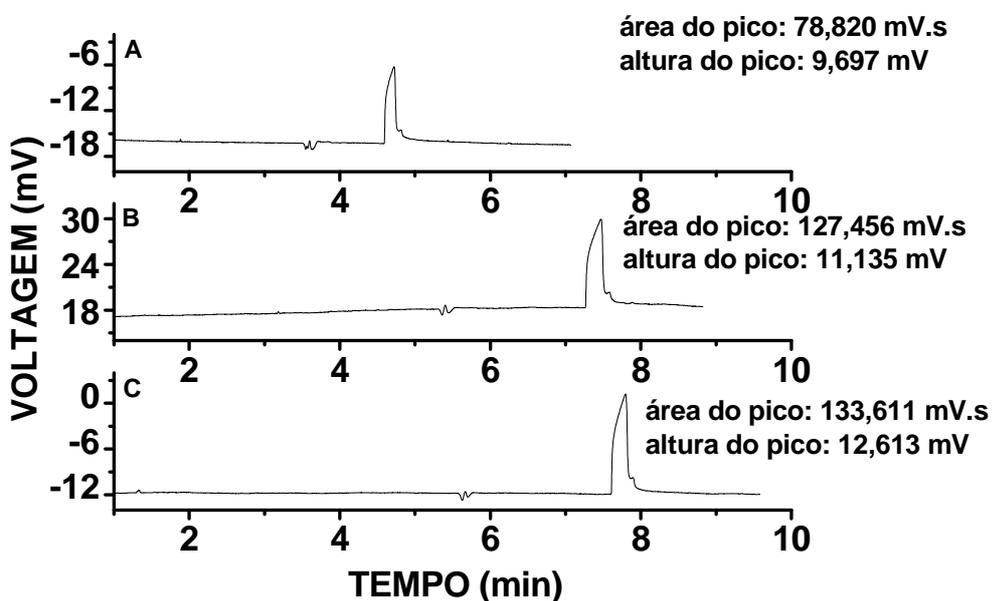


Figura 11 – Eletroferogramas obtidos na avaliação da concentração da solução de H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB. Voltagem de 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm. A- 100 mmol/L, B- 150 mmol/L e C- 200 mmol/L. Ácido cítrico 0,3 g/100mL.

7.2. INFLUÊNCIA DO pH DO ELETRÓLITO DE SEPARAÇÃO NO PERFIL DOS PICOS

O controle do pH foi fundamental na otimização da separação dos ácidos. A mobilidade eletroforética desses ácidos depende do pH do eletrólito, uma vez que são ácidos orgânicos fracos, cuja dissociação aumentará com o aumento do pH (LINDEBERG, 1996).

Sabendo que o sistema tampão é eficiente em um intervalo de pH correspondente ao pKa do eletrólito de separação em \pm uma unidade, e que o pKa do ácido bórico (eletrólito de separação) é de 9,24, analisou-se o perfil dos picos em pH 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0, mantendo-se constante a concentração dos ácidos oxálico, tartárico, cítrico, gálico e o L – aa em

0,0150, 0,0250, 0,0250, 0,0060 e 0,0150 g/100mL respectivamente. Os resultados são mostrados nas Figuras 12A, 12B, 12C, 12.1D e 12.1E.

Para a escolha do pH da solução tampão, avaliou-se o perfil e a resolução dos picos formados. Concluiu-se que para análise do ácido oxálico poderiam ser utilizados pH 10,0, 11,0 e 12,0 (Figura 12A), para o ácido tartárico, os valores de pH poderiam ser 9,0, 10,0, 11,0 ou 12,0 (Figura 12B), porém, ao usar eletrólito com pH 11,0 ou 12,0 houve flutuações na linha de base, para o ácido cítrico, os melhores resultados foram obtidos em pH 10,0, 11,0 e 12,0 (Figura 12C), para o ácido gálico, os melhores resultados foram obtidos utilizando pH 9,0 e 10,0 (Figura 12.1D) enquanto que para o ácido L – aa, os melhores resultados foram obtidos utilizando pH 9,0, 10,0 e 11,0 (Figura 12.1E). Diante desses resultados, escolheu-se pH 10,0 para realização das análises, uma vez que foram obtidos picos com boa simetria, área e/ou altura.

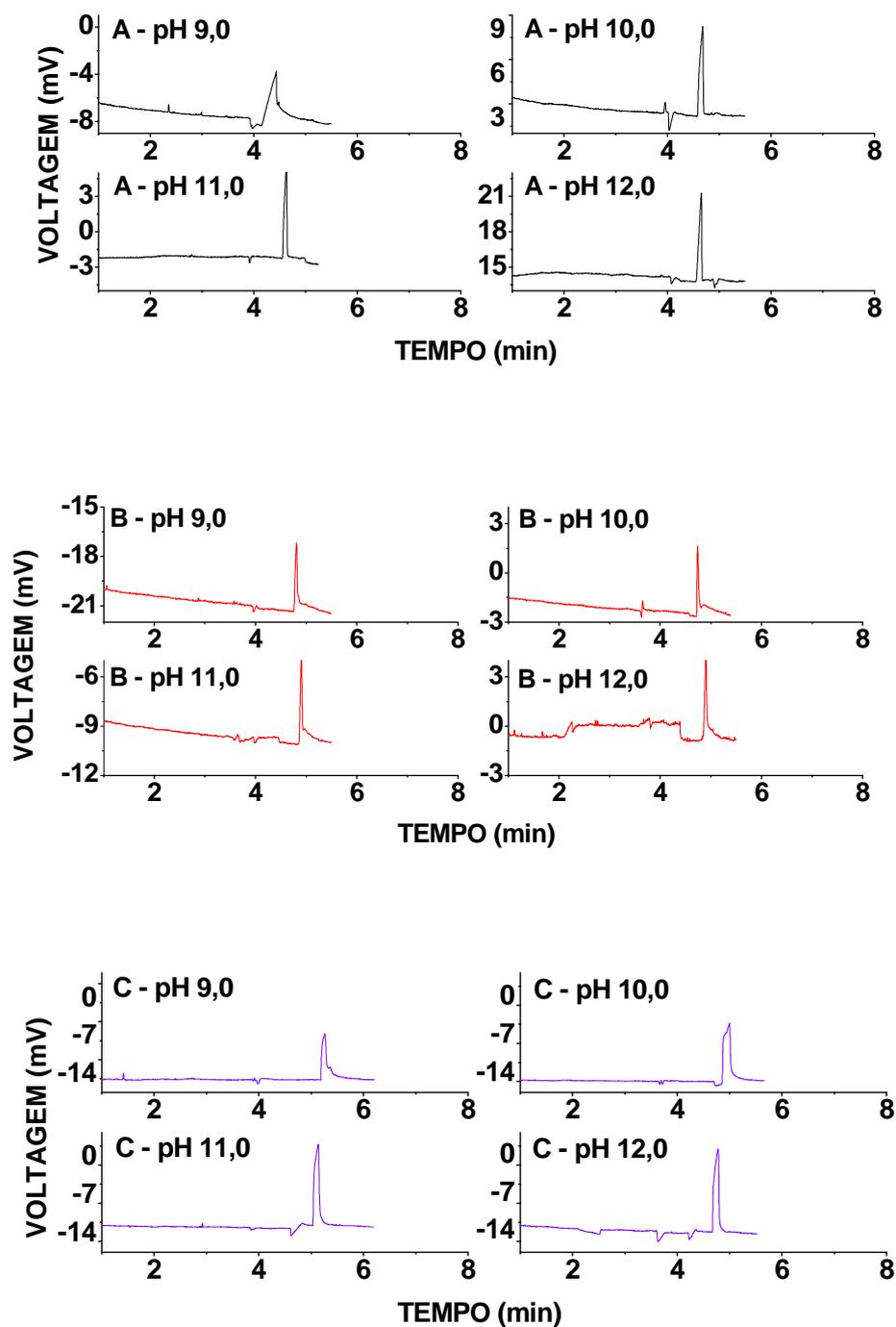


Figura 12 – Eletroferogramas para os ácidos orgânicos em diferentes valores de pH: A – ácido oxálico, B – ácido tartárico, C – ácido cítrico. Condições experimentais: 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm.

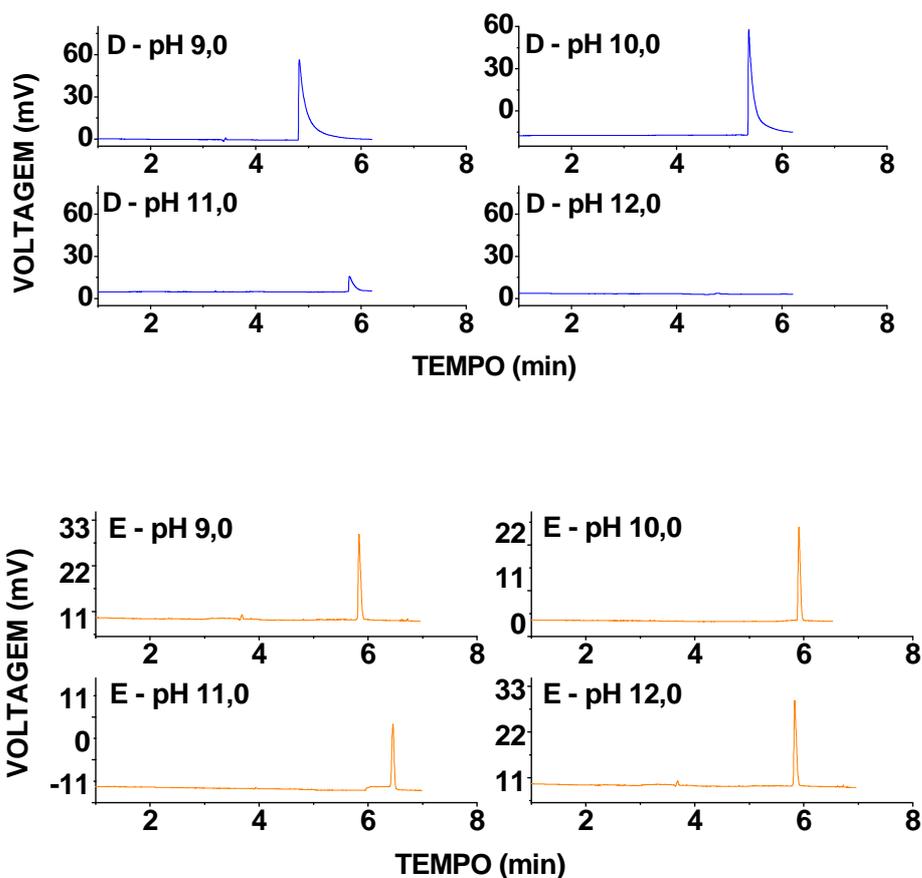


Figura 12.1 – Eletroferogramas para os ácidos orgânicos em diferentes valores de pH: D – ácido gálico, E – L – aa. Condições experimentais: 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, 15 s de injeção, $\lambda = 214$ nm.

7.3. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INJEÇÃO SOBRE O PERFIL DO PICO

Para verificar a influência do tempo de injeção sobre o perfil do pico, analisou-se uma amostra padrão, contendo as respectivas concentrações dos ácidos em estudo: 0,0150 g/100mL oxálico e L – aa, 0,0250g/100mL tartárico e cítrico, 0,0060 g/100mL para o gálico. A partir da análise da Figura 13A e 13B, verificou-se que o tempo de injeção influencia de forma direta na formação do eletroferograma, uma vez que o volume de amostra injetada é diretamente proporcional ao tempo de injeção (WEINBERGER, 2000). Injeções por 15 s (1 nL) puderam ser observados 5 picos com um bom perfil. Contudo, não foram observados os 5 picos quando foram

empregados 3 s de injeção hidrodinâmica (0,2 nL) (Figura 13A). Entretanto, com 30 s (2 nL) e 45 s (3 nL) de injeção, observaram-se todos os picos com sobreposição de picos dos ácidos tartárico e cítrico (Figura 13B). A partir desse estudo definiu-se trabalhar com 15 s de injeção.

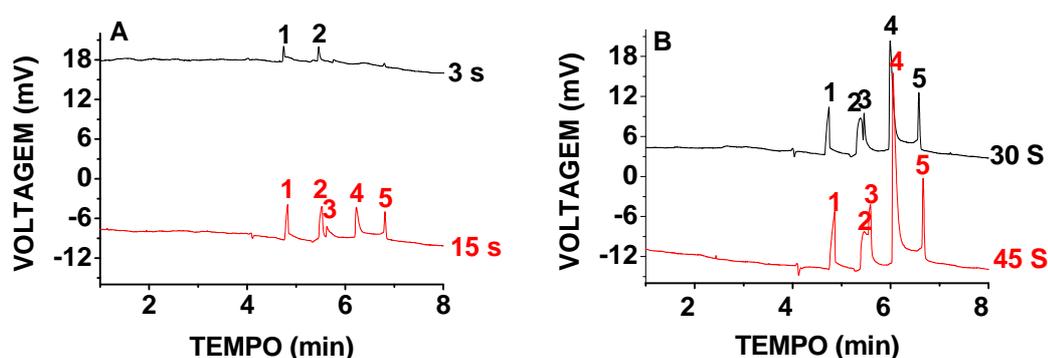


Figura 13 – Eletroferogramas – tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade na separação das 5 espécies estudadas. 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, 8 kV, $\lambda = 214$ nm. ácido oxálico (1), ácido tartárico (2), ácido cítrico (3), ácido gálico (4), L – aa (5).

7.4. USO DE METANOL NA SOLUÇÃO DE SEPARAÇÃO

Em CZE é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados, o qual é indicado em quatro situações: 1) para alterar a mobilidade do soluto, 2) modificar o fluxo eletroosmótico, 3) solubilizar solutos ou compostos na matriz da amostra, 4) reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar. Alguns autores relataram que o metanol é um dos solventes orgânicos mais utilizados como aditivo em soluções eletrolíticas, uma vez que este possui uma menor influência na mobilidade do fluxo eletroosmótico, e que quanto maior o percentual de aditivo usado na solução eletrolítica, menor a mobilidade eletroosmótica, aumentando o tempo de análise (SARMINI et al, 1997).

Neste trabalho, utilizou-se metanol como aditivo para alterar a mobilidade dos ânions, permitindo uma maior separação entre eles, principalmente a separação dos ácidos tartárico e cítrico. Para tal estudo

prepararam-se soluções com 100 mmol/L de ácido bórico pH 10,0 com diferentes proporções de metanol. O efeito da concentração de metanol foi observado injetando-se solução trabalho mista de ácidos orgânicos. O eletroferograma obtido neste estudo é mostrado na Figura 14. A adição de um solvente orgânico influenciou no perfil dos picos e no tempo de migração dos analitos, uma vez que, adicionando 5% de metanol houve pico não simétrico (ácido oxálico) e aumento do tempo de migração, porém, houve uma melhor separação entre os ácidos tartárico, cítrico, gálico e L - aa. Adicionando 20% de metanol, a simetria do pico do ácido oxálico ficou ainda mais comprometida, e a análise foi realizada num tempo ainda maior (11 min), apesar de ter melhorado significativamente a separação dos ácidos. O aumento no tempo de migração dos compostos deu-se em virtude da diminuição do fluxo eletrosmótico, provocado pela diminuição da mobilidade dos constituintes da solução tampão (SARMINI et al, 1997).

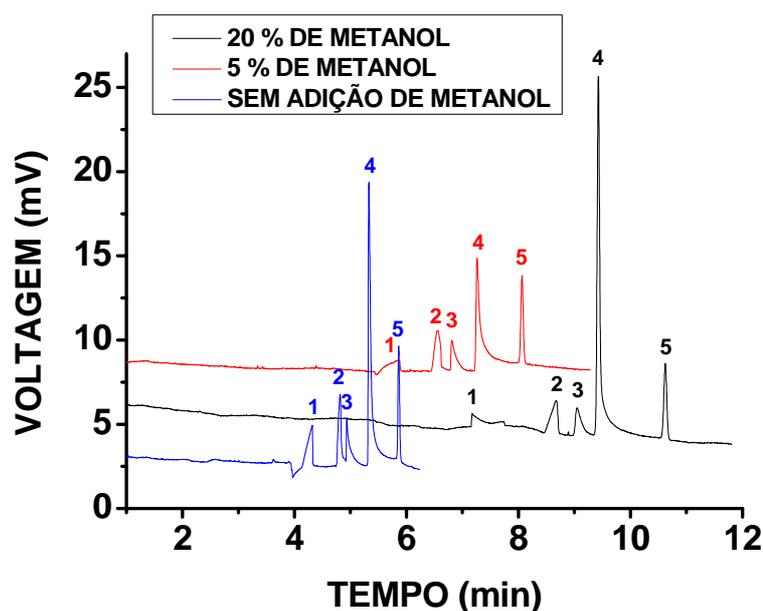


Figura 14 – Eletroferogramas obtidos no estudo da concentração de metanol no eletrólito de separação dos ácidos orgânicos. 100 mmol/L H_3BO_3 + 0,5 mmol/L CTAB pH 10,0, 15 s de injeção (4,5 cm de altura), 8 kV, $\lambda = 214$ nm, 0,0150 g/100mL ácido oxálico (1) e L - aa (5), 0,0250 g/100mL ácido tartárico (2) e cítrico (3), 0,0100 g/100mL ácido gálico (4).

A partir desses resultados, optou-se por não usar metanol no eletrólito de separação, uma vez que todos os ácidos orgânicos em soluções de referência foram separados de forma satisfatória com um menor tempo de análise.

7.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Por se tratar de uma metodologia analítica para determinação simultânea de ácidos orgânicos, foi necessário identificar o tempo de migração de cada analito e, posteriormente avaliar as características analíticas para cada ácido. A solução tampão borato, contendo 100 mmol/L, em pH 10,0, foi mantida. Preparam-se soluções mistas dos ácidos para facilitar a avaliação dos eletroferogramas. A solução mista dos ácidos orgânicos foi preparada nas concentrações: 0,0150 g/100mL de ácido oxálico e L – aa, 0,0250 g/100mL de ácido tartárico e cítrico, 0,0060 g/100mL de ácido gálico. A partir das injeções dessas soluções, efetuou-se a identificação de cada pico correspondente a cada ácido orgânico em estudo, Figura 15A. Posteriormente, para definir a ordem de migração de cada ácido orgânico, empregou-se a injeção de cinco soluções mistas, sendo que cada solução foi preparada sem a adição de um dos analitos, Tabela 7. Como resultado, o ácido que não foi adicionado na mistura não apresentou pico no eletroferograma correspondente, como evidenciado nas Figuras 15B, 15C, 15D 15E e 15F. Portanto, em ordem crescente de migração, identificaram-se os picos desses analitos como sendo: o ácido oxálico ($4,60 \pm 0,13$ min), ácido tartárico ($5,10 \pm 0,18$ min), ácido cítrico ($5,20 \pm 0,10$ min), ácido gálico ($5,50 \pm 0,17$ min) e o L – aa ($6,00 \pm 0,17$ min).

Tabela 7 – Identificação dos picos dos ácidos, oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa.

Mistura	(Ácido orgânico) Concentração (g/100mL)	Mistura	(Ácido orgânico) Concentração (g/100mL)
inicial	(1) 0,0150 g/100mL (2) 0,0250 g/100mL (3) 0,0250 g/100mL (4) 0,0060 g/100mL (5) 0,0150 g/100mL	3	(1) 0,0150 g/100mL (2) 0,0250 g/100mL (4) 0,0060 g/100mL (5) 0,0150 g/100m
1	(2) 0,0250 g/100mL (3) 0,0250 g/100mL (4) 0,0060 g/100mL (5) 0,0150 g/100mL	4	(1) 0,0150 g/100mL (2) 0,0250 g/100mL (3) 0,0250 g/100mL (5) 0,0150 g/100mL
2	(1) 0,0150 g/100mL (3) 0,0250 g/100mL (4) 0,0060 g/100mL (5) 0,0150 g/100mL	5	(1) 0,0150 g/100mL (2) 0,0250 g/100mL (3) 0,0250 g/100mL (4) 0,0060 g/100mL

(1) Ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido cítrico, (4) ácido gálico e (5) L – aa.

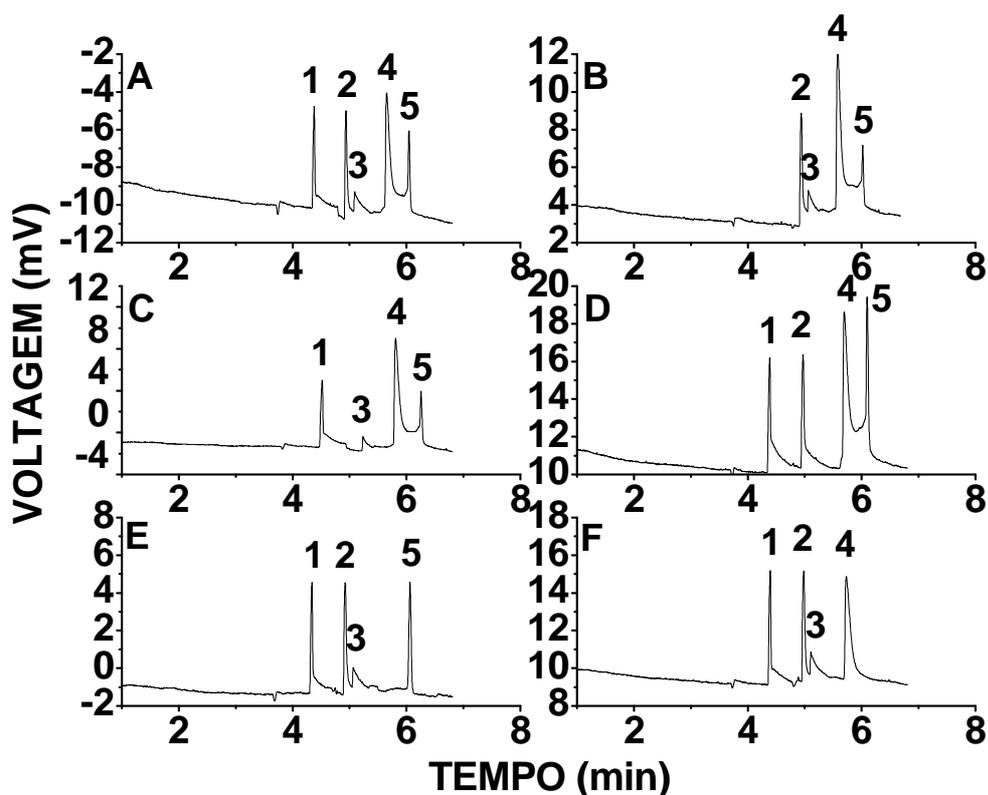


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos na identificação dos picos: (1) e (5) 0,0150 g/100mL, (2) e (3) 0,0250 g/100mL, (4) 0,0060 g/100mL, (1) ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido cítrico, (4) ácido gálico, (5) L – aa – 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, 15 s de injeção hidrodinâmica, 8 kV, $\lambda=214$ nm, A=mistura inicial, B=mistura 1, C=mistura 2, D=mistura 3, E=mistura 4, F=mistura 5.

7.6. CURVAS ANALÍTICAS

Para a maioria das análises químicas, a resposta de um determinado método deve ser inicialmente avaliada em relação a quantidade conhecida de analito (os padrões). Só então pôde-se interpretar qual seria a resposta correspondente a amostra com quantidade desconhecida. Para esse propósito, normalmente prepara-se uma curva de calibração, que mostra a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas de analito (HARRIS, 2008). Portanto, com as condições otimizadas, pH e concentração

do eletrólito de separação da solução tampão, tempo de injeção, foi necessário definir as condições de quantificação e aplicar o método proposto na determinação simultânea dos ácidos orgânicos em sucos de frutas frescos e industrializados. Optou-se pelo método de padronização externo empregando curvas analíticas preparadas com soluções dos ácidos orgânicos, o qual possibilita os cálculos das concentrações em todas as amostras analisadas. Os resultados podem ser observados nas figuras 16 a 22.

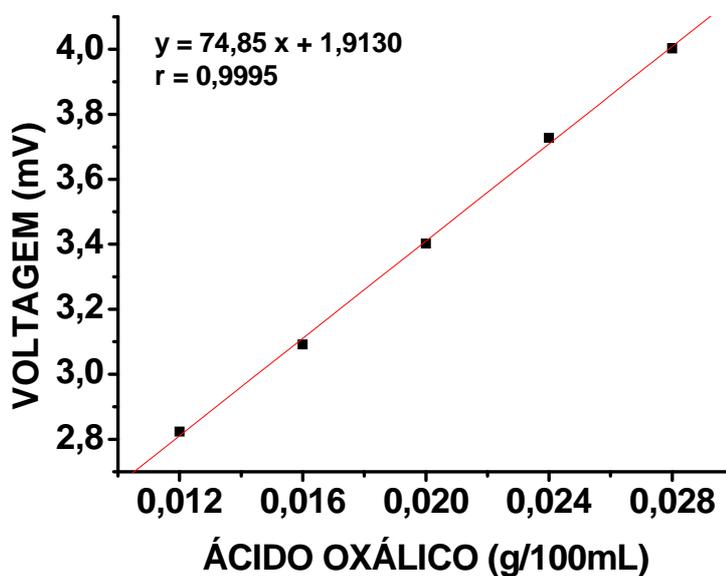


Figura 16 – Curva analítica para o ácido oxálico na presença do ácido tartárico, 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm.

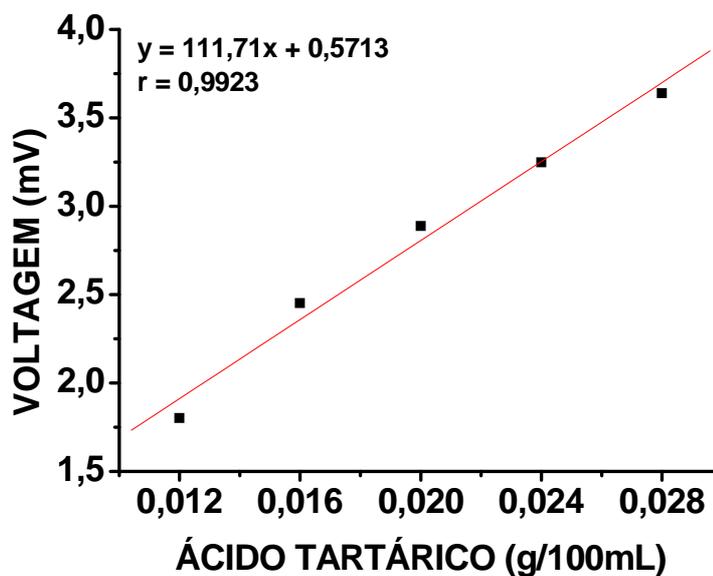


Figura 17 – Curva analítica para o ácido tartárico na presença do ácido oxálico, 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm.

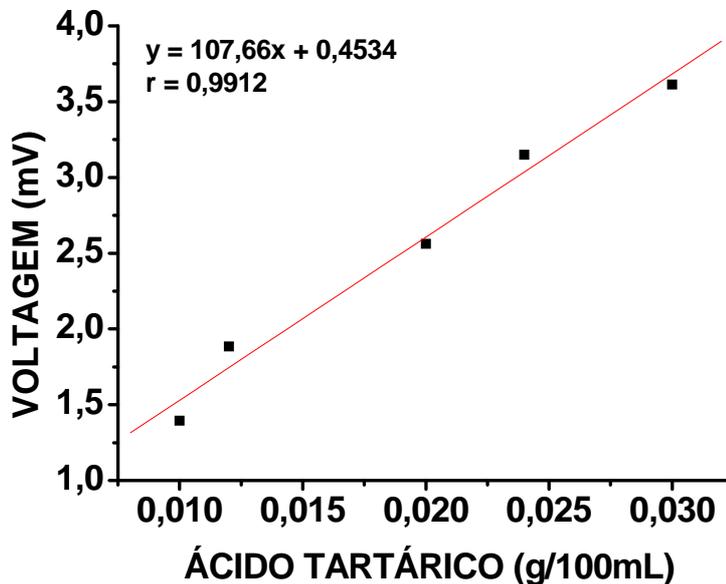


Figura 18 – Curva analítica para o ácido tartárico, 100 mmol/L H_3BO_3 , pH 10,0, 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção a 4,5 cm por gravidade $\lambda = 214$ nm.

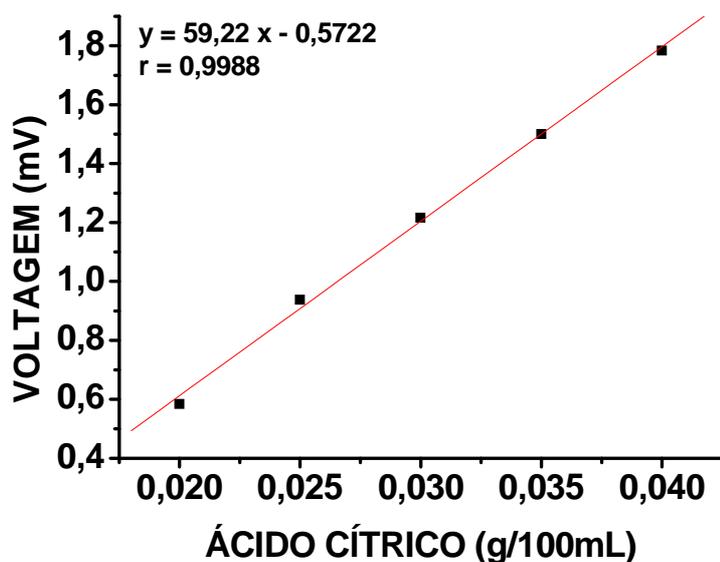


Figura 19 – Curva analítica para o ácido cítrico, 100 mmol/L H₃BO₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, λ=214nm.

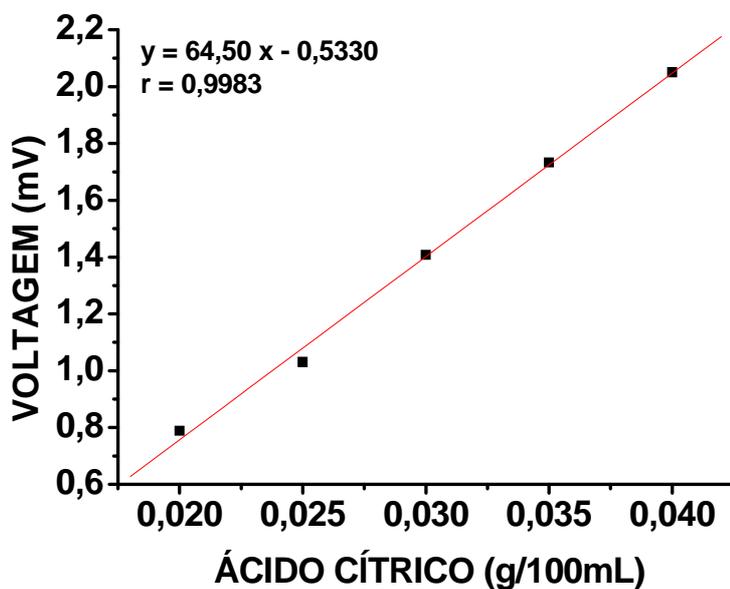


Figura 20 – Curva analítica para o ácido cítrico na presença do L – aa, 100 mmol/L H₃BO₃ pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s, λ = 214 nm.

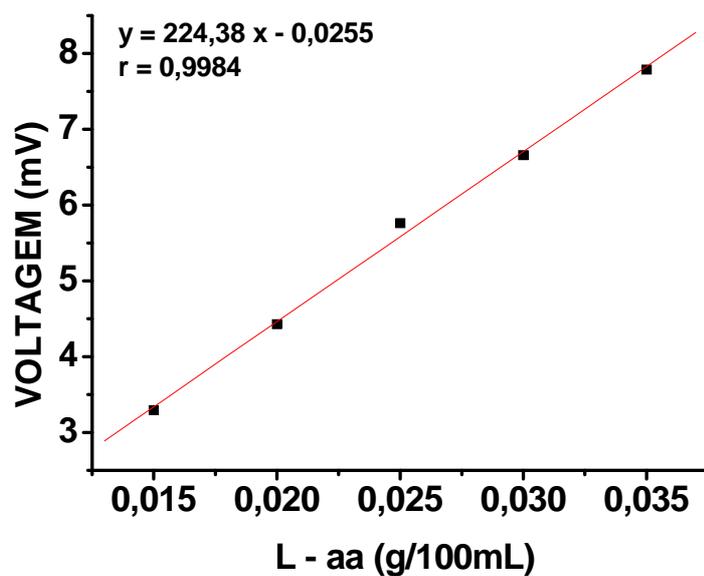


Figura 21 – Curva analítica para o L – aa na presença de ácido cítrico, 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s injeção, $\lambda = 214$ nm.

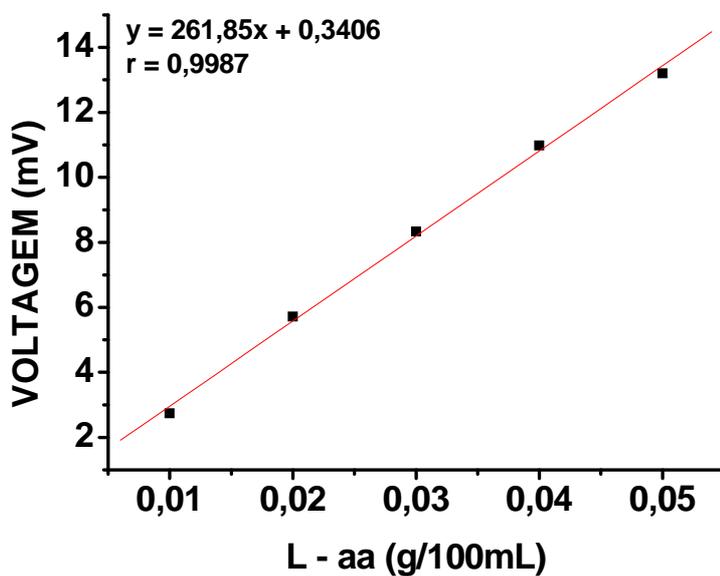


Figura 22 – Curva analítica para o L – aa, 100 mmol/L H_3BO_3 pH 10,0 + 0,5 mmol/L CTAB, voltagem de 8 kV, 15 s, $\lambda = 214$ nm.

7.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO

7.7.1. TEMPO DE ESTUDO E CONCENTRAÇÕES OBTIDAS

O estudo dos ácidos orgânicos nos sucos de frutas frescos foi feito no período compreendido entre 06/07 a 01/09/09, em dias alternados como mostrado na Tabela 8. A partir das suas análises, conforme mostrado nas Figuras 23 e 24, verificou-se que houve redução de 36,0% do L – aa no suco fresco de caju, armazenado a 0 °C durante 28 dias, 18,9% no suco fresco de acerola, armazenado a 0 °C durante 45 dias e 28,2% no suco fresco de laranja, armazenado a 23 °C durante 32 dias. Porém, não houve variação na concentração do ácido cítrico em nenhum suco fresco que o continha, apesar de o limão e a laranja serem armazenados a 23 °C, e o umbu-cajá a 0 °C, como mostrado na Figura 25. Não houve redução também nas concentrações dos ácidos oxálico e tartárico presentes nas amostras dos sucos frescos de carambola e de uva armazenados a 0 °C, durante o período do estudo, porém, apresentaram pequenas oscilações durante o tempo de estudo, Figura 26.

Tabela 8 – Resultados das concentrações dos ácidos orgânicos (g/100mL) dos sucos de frutas frescos durante o período do estudo.

Amostra / data da análise	Ácido Orgânico	
	Cítrico	L – aa
Limão / 28.07.09	5,3607	-
Limão / 04.08.09	5,3607	-
Limão / 10.08.09	5,5000	-
Limão / 21.08.09	5,4333	-
Limão / 28.08.09	5,8579	-
Laranja / 28.07.09	0,7701	0,0351
Laranja / 04.08.09	0,7798	0,0353
Laranja / 10.08.09	0,8960	0,0251
Laranja / 21.08.09	0,8167	0,0273
Laranja / 01.09.09	0,8307	0,0252
Caju / 14.07.09	-	0,1013
Caju / 15.07.09	-	0,0998
Caju / 20.07.09	-	0,0928
Caju / 21.07.09	-	0,0855
Caju / 11.08.09	-	0,0645
Caju / 12.08.09	-	0,0648
Umbu cajá / 28.07.09	1,2374	-
Umbu cajá / 04.08.09	1,2891	-
Umbu cajá / 08.08.09	1,2901	-
Umbu cajá / 11.08.09	1,2643	-
Acerola / 06.07.09	-	1,0854
Acerola / 18.08.09	-	1,0560
Acerola / 21.08.09	-	0,9129
	Oxálico	Tartárico
Carambola / 28.07.09	0,0333	0,1787
Carambola / 04.08.09	0,0258	0,1874
Carambola / 11.08.09	0,0457	0,1458
Uva / 14.07.09	-	0,3887
Uva / 20.07.09	-	0,3579
Uva / 28.07.09	-	0,3317
Uva / 12.08.09	-	0,3300

As análises foram feitas em triplicatas.

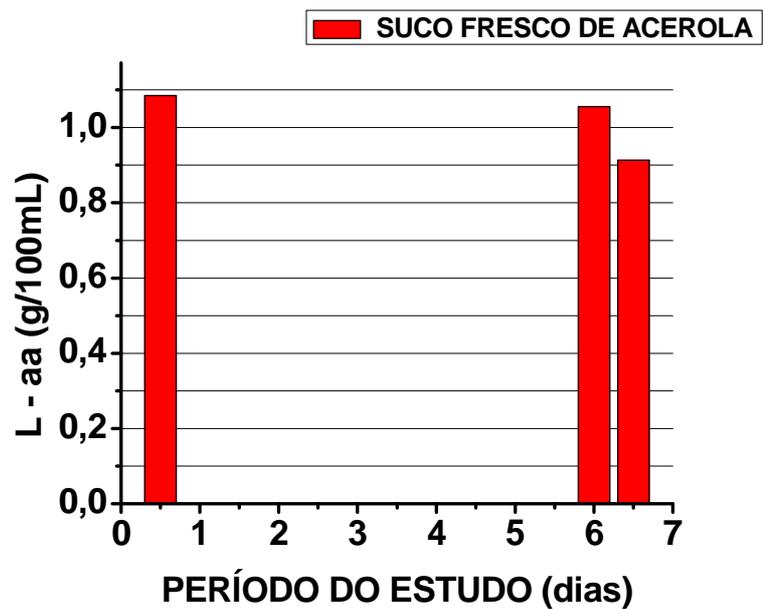


Figura 23 – Variações das concentrações obtidas no suco fresco durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 5,62 dias; 45 dias).

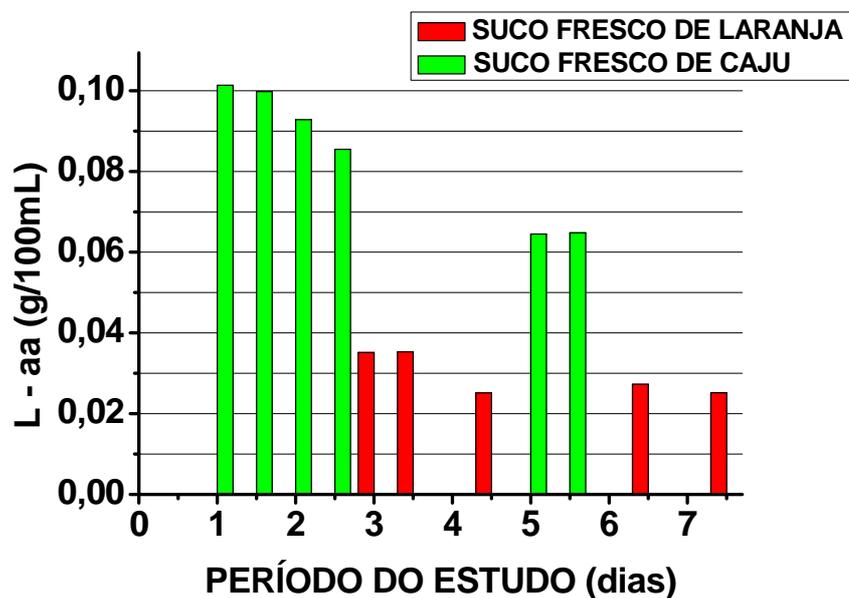


Figura 24 – Variações das concentrações obtidas nos sucos frescos durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 6 dias; 45 dias).

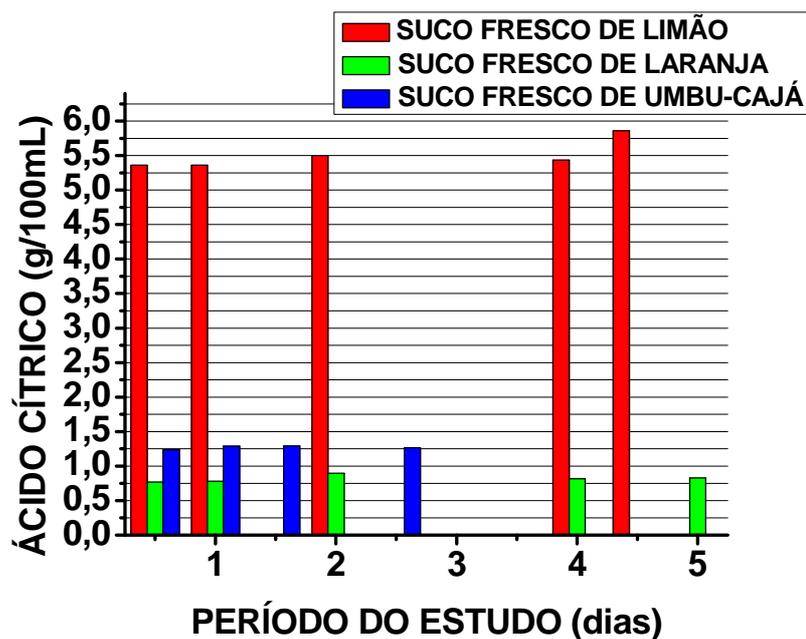


Figura 25 – Variações das concentrações obtidas nos sucos frescos durante o período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 6,5 dias; 33 dias).

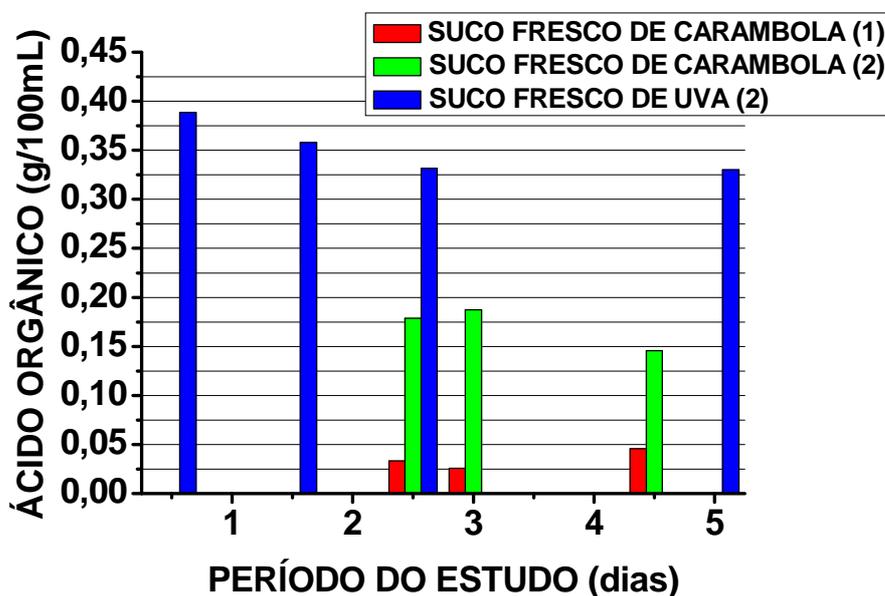


Figura 26 – Variações das concentrações obtidas dos ácidos oxálico (1) e tartárico (2) avaliadas nos sucos frescos no período do estudo. (Escala: 0-1 equivale a 5,5 dias; 28 dias).

Para os sucos industrializados o estudo ocorreu do dia 21/09 a 17/11/09, Tabela 9.

A partir da análise dos sucos industrializados, conforme mostrado na Figura 27, percebeu-se que houve redução de 15,2% de ácido cítrico no suco misto B, armazenado a 23 °C após 56 dias e de 59,5% no suco D armazenado a 23 °C após 56 dias. Os resultados demonstraram ainda redução de 99,4% do L – aa no suco misto A, armazenado a 23 °C após 54 dias de aberto e redução de 100% do L – aa no suco misto B armazenado a 23 °C após 56 dias de aberto, Figura 28.

Esses resultados demonstraram que o L – aa foi oxidado durante o tempo de armazenagem das amostras, independentemente da temperatura de estocagem, considerando tanto os sucos frescos como os industrializados, enquanto que para o ácido cítrico só houve redução em duas amostras de sucos industrializados. Os eletroferogramas obtidos a partir das análises dos sucos frescos e dos industrializados são mostrados nas Figuras 29 e 30.

Tabela 9 – Resultados das concentrações (g/100mL) dos ácidos orgânicos nos sucos industrializados durante o período do estudo.

Amostra / data da análise	Ácido orgânico	
	Cítrico	L – aa
A / 23.09.09	0,4238	0,0247
A / 03.10.09	0,4008	0,0129
A / 17.11.09	0,4351	0,0016
B / 21.09.09	0,4042	0,0172
B / 23.09.09	0,4315	0,0114
B / 03.10.09	0,4443	0,0079
B / 17.11.09	0,3661	0,0000
C / 05.10.09	0,4296	-
C / 17.11.09	0,4350	-
D / 21.09.09	0,4514	-
D / 23.10.09	0,2725	
D / 17.11.09	0,1828	
E / 03.10.09	0,2306	-
E / 23.10.09	0,2725	-

A = suco misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = suco misto de laranja, limão e tangerina D = suco de goiaba, E = suco misto de maçã, limão e uva. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

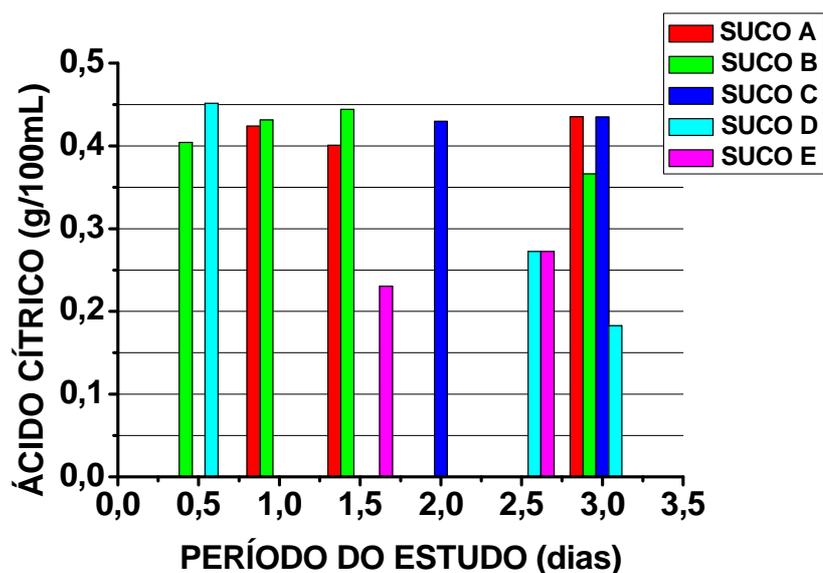


Figura 27 – Variações das concentrações obtidas nos sucos industrializados durante o período do estudo. A = misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = misto de laranja, limão e tangerina D = goiaba, E = misto de maçã, limão e uva, (Escala: 0-1 equivale a 16 dias, 56 dias).

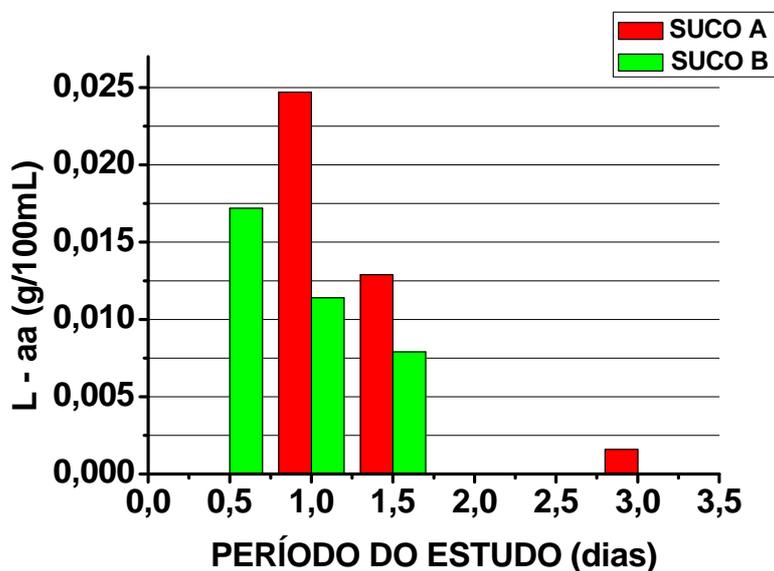


Figura 28 – Variações das concentrações nos sucos industrializados durante o período do estudo. A = misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = misto de maçã, laranja, tangerina e limão. (Escala: 0-1 equivale a 16 dias, 56 dias).

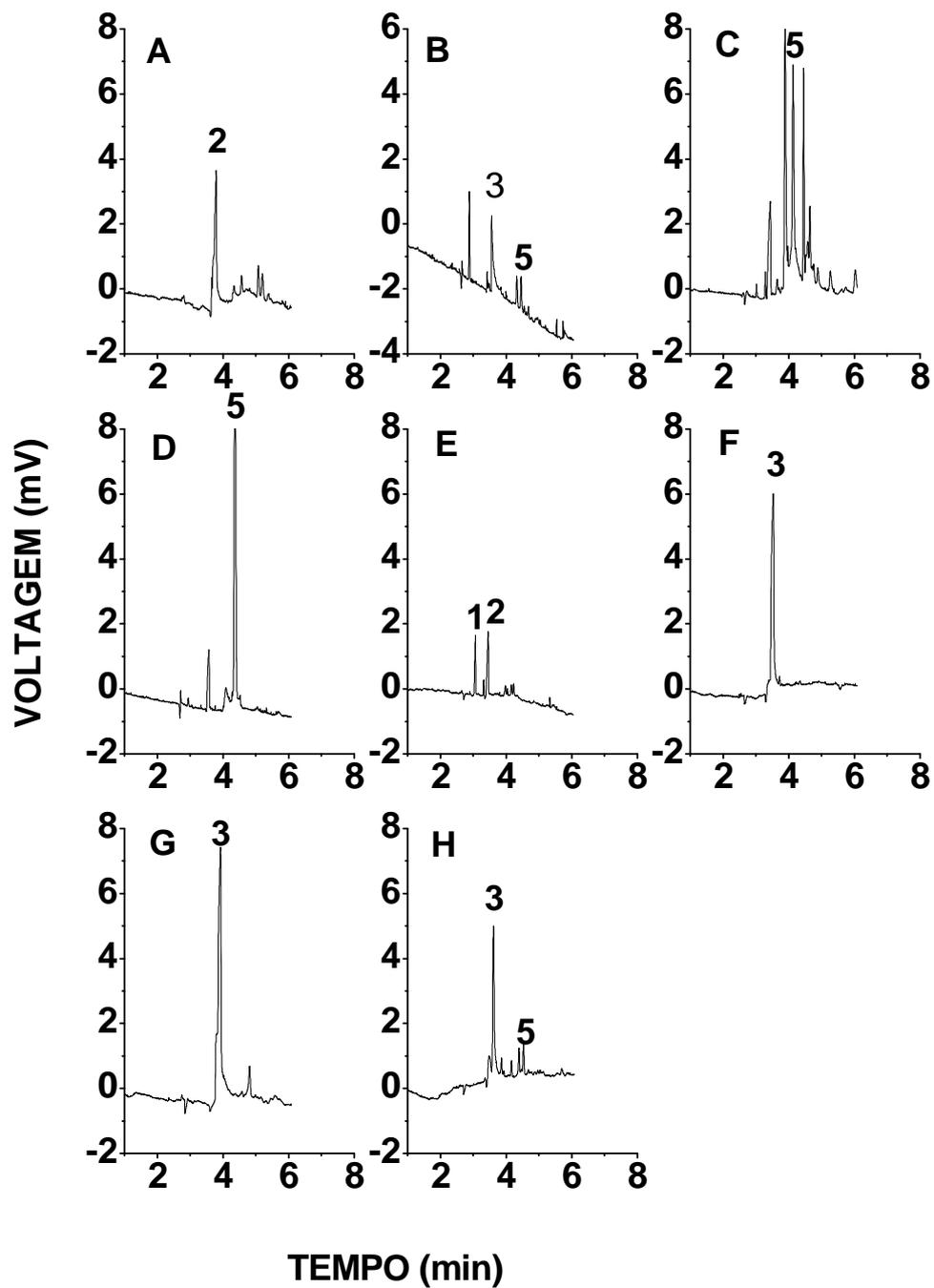


Figura 29 – Eletroferogramas dos ácidos orgânicos na amostras dos sucos frescos: A – de uva, B – morango, C – caju, D – acerola, E – carambola, F – de limão, G – umbu-cajá, H – laranja; (1) ácido oxálico (2) ácido tartárico (3) ácido cítrico (5) L – aa.

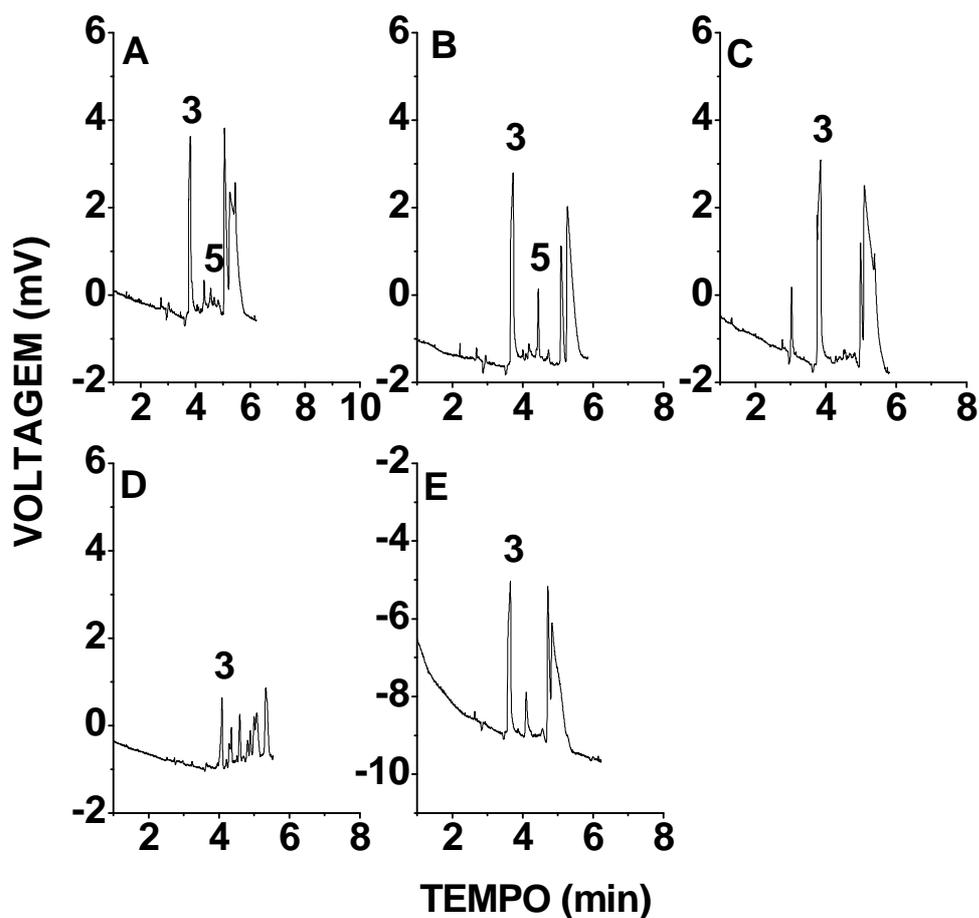


Figura 30 – Eletroferogramas dos ácidos orgânicos na amostras dos sucos industrializados. A = Suco misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = suco misto de laranja, limão e tangerina D = suco de goiaba, E = suco misto de maçã, limão e uva (3) ácido cítrico (5) L – aa.

Avaliação da redução de ácido ascórbico é, na verdade, um dos principais objetivos de pesquisadores na área de alimentos. Pode-se destacar o estudo feito por SILVA et al 2004 que encontraram redução de 84 a 92% no conteúdo de L-aa em amostras do pseudo fruto do caju, armazenados por 1 mês, a 4 °C; CAMPOS et al 2002, encontraram redução de 12% do L –aa em amostras de suco de caju clarificado estocado a 4 °C, durante um mês; JUSTI et al. 2000, encontraram redução de 23% no conteúdo de L – aa no camu-camu armazenado a -18 °C durante 28 dias.

Os trabalhos propostos por CORTE et al., 1997 também mostraram redução de 3,5% do L – aa em amostras de suco de acerola congelado a -18 °C após 1 mês de armazenamento.

Nas Tabelas 10 e 11, têm-se as médias das concentrações em g/100mL dos ácidos orgânicos encontrados nas amostras dos sucos frescos e das amostras dos sucos industrializados. A maior quantidade de ácido orgânico encontrado nos sucos de frutas frescos foi a do cítrico no limão, com 5,6440 g/100mL \pm 0,2200 e a menor foi a do L – aa na laranja, com 0,0286 g/100mL \pm 0,0050, enquanto que nas amostras dos sucos industrializados a maior quantidade foi a do ácido cítrico no suco de goiaba com 0,4514 g/100mL \pm 0,0116, e a menor foi a do L – aa no suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão com 0,0132 g/100mL \pm 0,0046.

Tabela 10 – Médias dos resultados dos ácidos orgânicos (g/100mL) nas amostras dos sucos frescos.

Amostra(n)	Ácido Orgânico			
	Oxálico	Tartárico	Cítrico	L – aa
Limão (27)	-	-	5,6440 \pm 0,2230	-
Laranja (30)	-	-	0,8012 \pm 0,0480	0,0286 \pm 0,0050
Carambola (18)	0,0346 \pm 0,0090	0,1695 \pm 0,0180	-	-
Caju (21)	-	-	-	0,0859 \pm 0,0150
Umbu caja (12)	-	-	1,2699 \pm 0,0250	-
Uva (12)	-	0,3527 \pm 0,0270	-	-
Acerola (12)	-	-	-	1,0181 \pm 0,0920
Morango (3)	-	-	0,5038 \pm 0,0020	0,0753 \pm 0,0070

n = número de análises.

Tabela 11 – Médias dos resultados dos ácidos orgânicos (g/100mL) nas amostras dos sucos industrializados.

Amostra (n)	Ácido orgânico	
	Cítrico	L – aa
A (6)	0,4115 ± 0,0116	0,0168 ± 0,0068
B (9)	0,4243 ± 0,2995	0,0132 ± 0,0046
C (3)	0,4296 ± 0,0083	-
D (3)	0,4514 ± 0,0116	-
E (3)	0,2306 ± 0,0217	-

n = número de análises, A = Suco misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa, B = suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão, C = suco misto de laranja, limão e tangerina D = suco de goiaba, E = suco misto de maçã, limão e uva.

A partir da análise dos resultados mostrados na Tabela 12, pode-se comparar os resultados de alguns ácidos orgânicos obtidos através da ECZ discutidos em outros trabalhos, com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 12 – Comparando os resultados dos ácidos orgânicos deste trabalho com outros. Dados: ácidos 1-oxálico, 2-tartárico, 3-cítrico, 5-L – aa.

Referência Método	1 (g/100mL) fruta	2 (g/100mL) fruta	3 (g/100mL) fruta	5 (g/100mL) fruta
CARVALHO et al., 2010	0,0346 Carambola	0,1695 Carambola 0,3527 Uva	5,6440 Limão 0,8012 Laranja	0,0286 Laranja 1,0181 Morango
CHOI et al., 1997	-	-	-	0,0069 Laranja 0,0071 Morango
YANG et al., 2000	-	0,7980 Uva	0,3200 Laranja	-
SAAVEDRA et al., 2000	-	-	1,1200 Laranja	-
MATO et al. 2007	-	0,2302 Uva		-

O ácido gálico não foi identificado em nenhum trabalho.

7.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de um conjunto de ensaios propõe verificar se um determinado método analítico é apto a produzir resultados confiáveis e adequados aos objetivos a que se propõe. A validação permite ter conhecimento das limitações e da confiabilidade das medidas obtidas na análise por meio da metodologia desenvolvida (BRITO et al., 2003) Neste trabalho, foram avaliadas a linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção, quantificação e repetibilidade.

7.8.1. LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO

Os coeficientes de correlação (r) das curvas dos analitos foram superiores a 0,9912 (Tabela 13), demonstrando uma boa relação de linearidade entre a concentração e o sinal analítico, uma vez que sua eficiência máxima consiste em ter valores de coeficiente de correlação maior que 0,9990 (ANVISA). Para valores aceitáveis, a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,9900 no mínimo, e o INMETRO um valor acima de 0,9000 no mínimo. O método desenvolvido mostrou ótimos resultados dentro das faixas de trabalho para cada ácido orgânico (Tabela 14).

Tabela 13 – Linearidade para os ácidos oxálico, tartárico, cítrico, gálico e L – aa, na faixa de concentração de 0,0040 a 0,0450.

Ácido orgânico	Curva de calibração	Coefficiente de correlação (r)
(1) na presença do (2)	$y = 74,8500x + 1,9130$	0,9995
(2) na presença do (1)	$y = 111,7100x + 0,5713$	0,9923
(2)	$y = 107,6575x + 0,4534$	0,9912
(3)	$y = 59,2200x - 0,5722$	0,9988
(3) na presença do (5)	$y = 64,5000x - 0,5330$	0,9983
(5) na presença do (3)	$y = 224,3800x - 0,0255$	0,9984
(5)	$Y = 261,8460 + 0,3406$	0,9987

Ácidos: (1) oxálico (2) tartárico (3) cítrico (4) gálico (5) L – aa.

Tabela 14 – Faixa de trabalho dos ácidos orgânicos.

Ácidos Orgânicos					
	Oxálico	Tartárico	Cítrico	Gálico	L-aa
FT	0,0050 a	0,0100 a	0,0200 a	0,0040 a	0,0150 a
	0,0250	0,0300	0,0400	0,0120	0,0450

FT = faixa de trabalho.

7.8.2. SENSIBILIDADE

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, o qual pode ser expresso em função da curva analítica de calibração, quanto maior for o valor do coeficiente angular, mais sensível será o método. Considerando a análise dos ácidos orgânicos com curvas de calibração em função da concentração x altura do pico, o método apresentou maior sensibilidade para o L – aa, uma vez que demonstrou o maior valor de coeficiente angular, como pode ser visto na Tabela 13.

7.8.3. PRECISÃO

Neste trabalho, a precisão do método foi avaliado em três níveis de concentração para cada analito, sendo que as médias foram obtidas a partir de análise em triplicata. Os coeficientes de variação foram inferiores a 11,5% em todos os níveis (Tabela 15), denotando uma boa precisão da técnica.

Tabela 15 – Coeficientes de variação (CV) para os ácidos orgânicos nos níveis de concentração de 0,0100, 0,0150 e 0,0200 g/100mL.

g/100mL	Precisão (%)				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
0,0100	3,44	3,24	7,29	3,72	6,20
0,0150	5,74	4,10	3,05	5,06	10,38
0,0200	1,76	1,48	11,46	5,29	2,74

(1) ácido oxálico (2) ácido tartárico (3) ácido cítrico (4) ácido gálico (5) L – aa.

7.8.4. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

O processo mais utilizado para avaliar a exatidão de um método é o uso de materiais de referência certificado. Além disso, outras estratégias são usadas para avaliar a confiabilidade de um método, tais como, ensaios de recuperação ou comparação com um outro método. A recuperação (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. O teste de recuperação mostra o efeito de matriz sobre os resultados.

A eficiência do método varia em função da concentração da substância, na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações, por isso para a análise em nível de resíduos recomenda-se que se trabalhe em níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação, entretanto para componentes em maiores concentrações, os níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150% do nível esperado para a substância.

Foram feitas 61 adições padrão, sendo que 50 foram para os sucos de frutas frescos e 11 para os sucos de frutas industrializados. As recuperações obtidas variaram de 83,6 a 117,5% nos sucos frescos, e de 83,6 a 116,7% nos sucos de frutas industrializados (Tabelas 16 e 17). Esses

resultados mostraram ótimos valores de ensaios de recuperação, uma vez que ficaram dentro da faixa especificada pelo RIBANI (70 a 120% para esse nível de concentração), demonstrando que o método proposto é livre de interferência de matriz.

Tabela 16 – Recuperação dos ácidos orgânicos (g/100mL) nos sucos de frutas frescos.

Amostra	Massa dos ácidos orgânicos (g)		
	Adicionada	Recuperada	Recuperação (%)
Limão	(3) 0,0075	(3) 0,0071	(3) 95,24
Limão	(3) 0,0150	(3) 0,0132	(3) 88,00
Limão	(3) 0,0120	(3) 0,0138	(3) 114,8
Limão	(3) 0,0060	(3) 0,0054	(3) 90,90
Limão	(3) 0,0040	(3) 0,0040	(3) 101,0
Limão	(3) 0,0800	(3) 0,0894	(3) 111,8
Limão	(3) 0,0160	(3) 0,0179	(3) 112,3
Limão	(3) 0,0640	(3) 0,0610	(3) 95,30
Laranja	(3) 0,0010 (5) 0,0030	(3) 0,0009 (5) 0,0039	(3) 95,40 (5) 108,7
Laranja	(3) 0,0010 (5) 0,0030	(3) 0,0008 (5) 0,0033	(3) 90,20 (5) 108,6
Laranja	(3) 0,0120 (5) 0,0140	(3) 0,0126 (5) 0,0149	(3) 105,25 (5) 93,30
Laranja	(3) 0,0008 (5) 0,0020	(3) 0,0008 (5) 0,0023	(3) 103,20 (5) 115,0
Laranja	(3) 0,0060 (5) 0,0050	(3) 0,0051 (5) 0,0005	(3) 85,12 (5) 90,16
Laranja	(3) 0,0160 (5) 0,0080	(3) 0,0163 (5) 0,0085	(3) 102,00 (5) 106,0
Laranja	(3) 0,0060 (5) 0,0016	(3) 0,0068 (5) 0,0017	(3) 114,00 (5) 83,60
Laranja	(3) 0,0180 (5) 0,0120	(3) 0,1586 (5) 0,0124	(3) 88,10 (5) 103,3
Laranja	(3) 0,0130 (5) 0,0090	(3) 0,0137 (5) 0,0097	(3) 91,30 (5) 97,30
Morango	(3) 0,0120 (5) 0,0160	(3) 0,0109 (5) 0,0177	(3) 91,2 (5) 110,8
Caju	(5) 0,0042	(5) 0,0037	(5) 89,50
Caju	(5) 0,0030	(5) 0,0033	(5) 109,0
Caju	(5) 0,0036	(5) 0,0038	(5) 105,5
Umbu cajá	(3) 0,0030	(3) 0,0031	(3) 103,0
Umbu cajá	(3) 0,0020	(3) 0,0023	(3) 114,40
Umbu cajá	(3) 0,0020	(3) 0,0019	(3) 97,98
Acerola	(5) 0,0120	(5) 0,0103	(5) 85,70
Acerola	(5) 0,0008	(5) 0,0009	(5) 85,90
Carambola	(1) 0,0200 (5) 0,0060	(1) 0,0235 (2) 0,0057	(1) 117,5 (2) 95,00
Carambola	(1) 0,0080 (5) 0,0080	(1) 0,0081 (2) 0,0070	(1) 100,0 (2) 87,60
Carambola	(1) 0,0150 (2) 0,0060	(1) 0,0147 (2) 0,0062	(1) 98,00 (2) 96,00
Carambola	(1) 0,0040 (2) 0,0160	(1) 0,0047 (2) 0,0141	(1) 117,3 (2) 93,50
Carambola	(1) 0,0080 (2) 0,0080	(1) 0,0081 (2) 0,0070	(1) 100,8 (2) 88,17
Uva	(2) 0,0020	(2) 0,0025	(2) 105,8
Uva	(2) 0,0016	(2) 0,0013	(2) 87,43
Uva	(2) 0,0060	(2) 0,0051	(2) 102,5
Uva	(2) 0,0006	(2) 0,0007	(2) 116,0

(1) ácido oxálico (2) ácido tartárico (3) ácido cítrico (5) L – aa.

Tabela 17 – Recuperação dos ácidos orgânicos (g/100mL) nos sucos de frutas industrializados.

Amostra	Ácido Orgânico	Massa adicionada (g)	Massa recuperada (g)	Recuperação %
A	(3) 0,4238	(3) 0,0020	(3) 0,0016	(3) 83,60
	(5) 0,0247	(5) 0,0070	(5) 0,0069	(5) 98,63
A	(3) 0,4008	(3) 0,0006	(3) 0,0006	(3) 108,7
	(5) 0,0129	(5) 0,0014	(5) 0,0014	(5) 100,0
B	(3) 0,4042	(3) 0,0008	(3) 0,0009	(3) 106,7
	(5) 0,0172	(5) 0,0040	(5) 0,0039	(5) 98,55
B	(3) 0,4315	(3) 0,0014	(3) 0,0012	(3) 88,70
	(5) 0,0114	(5) 0,0040	(5) 0,0045	(5) 83,60
C	(3) 0,4341	(3) 0,0016	(3) 0,0017	(3) 105,9
D	(3) 0,4509	(3) 0,0025	(3) 0,0024	(3) 95,76
E	(3) 0,2284	(3) 0,0060	(3) 0,0052	(3) 86,16

A = Suco industrializado misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa; B = Suco industrializado misto de maçã, laranja, tangerina e limão; C = Suco industrializado misto de laranja, limão e tangerina; D = Suco industrializado de goiaba e E = Suco industrializado misto maçã, limão e uva. (3) ácido cítrico (5) L – aa.

7.8.5. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros analíticos que auxiliam na determinação e escolha de um método analítico, os quais estão associados a sinais analíticos instrumentais, dentre eles a magnitude de sinal analítico, que indica a concentração de um elemento possível a ser medido e a linha de base. O limite de detecção (LD) é a concentração do analito a um dado sinal analítico correspondente ao valor de 2 ou 3 vezes a magnitude da linha de base com ruído (IUPAC). A linha de base com ruído pode ser analisada, estatisticamente, fazendo-se pelo menos dez medidas de um branco para obter o sinal observado e determinando a estimativa do desvio padrão destas medidas.

O limite de quantificação (LQ) pode ser calculado considerando 10 vezes a magnitude da linha de base com ruído (IUPAC).

Neste trabalho, o LD e o LQ foram calculados considerando a linha de base formada com o sinal-ruído obtido a partir das análises, sendo que para o cálculo do LD e LQ, consideraram-se 11 medidas do branco, em um intervalo de tempo de 4 a 6 min, uma vez que todos os ácidos em estudo migraram neste intervalo de tempo (Tabela 18).

Tabela 18 – Limite de Detecção e Quantificação (g/100mL), para os ácidos orgânicos estudados.

Ácidos Orgânicos					
	Oxálico	Tartárico	Cítrico	Gálico	L-aa
LD	0,0005	0,0056	0,0155	0,0009	0,0045
LQ	0,0016	0,0187	0,0517	0,0031	0,0151

LD = limite de detecção LQ = limite de quantificação (g/100 mL).

7.8.6. REPETIBILIDADE

A repetibilidade de um método representa a concordância entre os resultados de análise de um determinado método realizado, considerando o mesmo laboratório, analista e instrumento. Para o cálculo, podem ser realizadas 9 determinações, sendo 3 em concentrações diferentes, no qual cada concentração é feita em triplicata, ou com no mínimo de 5 determinações para uma única concentração (BRITO et al., 2003). Neste trabalho, a repetibilidade do método foi estimada analisando-se amostras consecutivas das frutas de sucos frescos de limão e sucos frescos de laranja num mesmo dia (n=5), e em dias distintos (n=5), como pode ser visto na Tabela 19. O teor de ácido cítrico no suco fresco de limão analisado no mesmo dia e em dias distintos foi de 5,8282 g/100mL \pm 0,0170 e 5,5025 g/100mL \pm 0,2069, respectivamente, demonstrando que a variação dos resultados do ácido cítrico foi maior nas análises feitas em dias distintos. O teor de ácido cítrico no suco fresco da laranja analisado no mesmo dia e em dias distintos foi de 0,8012 g/100mL \pm 0,0500 e 0,8187g/100mL \pm 0,0500,

respectivamente, apresentando uma mesma variação. O teor de L – aa para o suco fresco da laranja apresentou uma maior variação em dias alternados, passando de 0,0287 g/100mL ± 0,0050 e 0,0296 g/100mL ± 0,0052, respectivamente. Os resultados mostraram uma maior variação das concentrações das análises feitas em dias distintos.

Tabela 19 – Concentrações obtidas para o ácido cítrico e o L – aa no limão e na laranja no mesmo dia e entre-dias.

Amostras - data	Ácidos orgânicos (g/100mL)	
	Cítrico	L – aa
Limão - 28/08/09	5,8579	-
Limão - 28/08/09	5,8217	-
Limão - 28/08/09	5,8166	-
Limão - 28/08/09	5,8140	-
Limão - 28/08/09	5,8309	-
Média ± SD	5,8282 ± 0,0170	-
Limão - 28/07/09	5,3607	-
Limão - 04/08/09	5,3607	-
Limão - 10/08/09	5,5000	-
Limão - 21/08/09	5,4333	-
Limão - 28/08/09	5,8579	-
Média ± SD	5,5025 ± 0,2069	-
Laranja - 01/09/09	0,8307	0,0252
Laranja - 01/09/09	0,7326	0,0253
Laranja - 01/09/09	0,7899	0,0275
Laranja - 01/09/09	0,8107	0,0244
Laranja - 01/09/09	0,8062	0,0244
Média ± SD	0,8012 ± 0,0500	0,0286 ± 0,0050
Laranja - 28/07/09	0,7701	0,0351
Laranja - 04/08/09	0,7798	0,0353
Laranja - 10/08/09	0,8960	0,0251
Laranja - 21/08/09	0,8167	0,0273
Laranja - 01/09/09	0,8307	0,0252
Média ± SD	0,8187 ± 0,0500	0,0296 ± 0,0052

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido foi adequado para a determinação dos ácidos orgânicos oxálico, tartárico, cítrico, gálico e o L – aa, em sucos de frutas frescas e em sucos de frutas industrializados. O método mostrou-se simples, eficiente, rápido (< 6 min) de baixo custo e de fácil operação.

Alguns parâmetros na montagem do sistema eletroforético de zona foram fundamentais para a separação e quantificação dos ácidos, tais como: a concentração do eletrólito de separação e o uso de um inversor do fluxo eletrosmótico (CTAB), o pH da solução tampão, a inversão da polaridade, o comprimento de onda de absorção molecular, a voltagem, o tempo e a altura de injeção hidrodinâmica, e o não uso de um solvente orgânico.

Segundo os parâmetros de validação, o método apresentou boa linearidade para as faixas de trabalho consideradas, boa sensibilidade, e ótimos coeficientes de correlação (r). O coeficiente de variação variou de 1,48 a 11,46%, os limites de detecção variaram de 0,0005 a 0,0155 g/100mL, e os limites de quantificação variaram de 0,0016 a 0,0517 g/100mL, respectivamente. Os ensaios de recuperação nas amostras dos sucos de frutas frescos variaram de 83,6 a 117,5%, e nos sucos industrializados a variação foi de 83,6 a 108,7%, demonstrando ótimos resultados de recuperação.

Foram detectados e quantificados os ácidos oxálico, tartárico, cítrico, e o L – aa nas amostras dos sucos de frutas frescos e nos sucos de frutas industrializados, sendo que o ácido oxálico foi quantificado no suco fresco de carambola, o ácido tartárico nos sucos frescos de carambola e uva, o ácido cítrico nos sucos frescos de limão, laranja, umbu cajá e morango, e nos sucos industrializados A, B, C, D e E (A = suco industrializado misto de

acerola, laranja enriquecido com L – aa; B = suco industrializado misto de maçã, laranja, tangerina e limão; C = suco industrializado misto de laranja, limão e tangerina; D = suco industrializado de goiaba e E = suco industrializado misto maçã, limão e uva), o L – aa foi encontrado nos sucos frescos de laranja, caju, acerola e morango, e nos sucos industrializados A e B (A = suco industrializado misto de acerola, laranja enriquecido com L – aa; B = suco industrializado misto de maçã, laranja, tangerina e limão).

Não houve redução, tanto na concentração do ácido oxálico quanto na concentração do ácido tartárico, nas amostras de sucos que os continham, porém, houve redução do ácido cítrico em duas amostras de sucos industrializados (suco misto de maçã, laranja, tangerina e limão e no suco de goiaba). Em relação a concentração do L – aa, houve redução em todas as amostras de sucos que o continham, sendo que essa redução foi ainda mais expressiva nos sucos industrializados.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido a grande facilidade de implementação da eletroforese capilar de zona, e a facilidade de se trabalhar com frutas e sucos industrializados, uma vez que as amostras são preparadas a partir do suco obtido com posterior diluição com água destilada, pretende-se trabalhar com outras frutas, com frutas de diferentes regiões do país, e abranger um número maior de ácidos orgânicos;

Pretende-se monitorar o teor de ácidos orgânicos nas frutas num período de inter-safra;

Colaborar com outros trabalhos na determinação dos ácidos orgânicos em amostras de sucos de frutas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – www.anvisa.gov.br, acessada dia 20.09.2009.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão, **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ALTRIA, K.D. Capillary Electrophoresis Code Book, Principles, Operation and Application. New Jersey, **Humana Press**, 1996. 348p.

ARELLANO, M.; ANDRIANARY, J.; DEDIEU, F.; COUDERC, P.; PUIG, P. Method development and validation for the simultaneous determination of organic acids by capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.765, p.321-328, 1997.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. Química Analítica Quantitativa Elementar. São Paulo, **Editora Edgard Blucher LTDA**, Segunda Edição Sexta Reimpressão, 1998. 259p.

BAKER, D.R. Capillary Electrophoresis. New York, **John Wiley & Sons INC**, 1995. 244p.

BECKERS, J.L.; GEBAUER, P.; BOCEK, P. System zones in capillary zone electrophoresis, **Electrophoresis**. v.22, p.3648-3658, 2001.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, **Química Nova**. v.28, n.4, p.683-691, 2005.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão, **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba, v.13, p.129-143, 2003.

CAMILLERI, P. Capillary Electrophoresis Theory and Practice. London, **CRC Press**, 1993. 495p.

CAMPOS, D.C.P.; SANTOS, A.S.; WOLKOFF; MATTA, V.M.; CORRÊA, L.M.C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by micro filtration, **Desalination**. v.1, n.148, p.61-65, 2002.

CARLSON, B.L.; TABACCHI, M.H. Loss of vitamin C in vegetables during the foodservice cycle, **Journal American Dietetic Association**. v.88, n.1, p.65-67, 1988.

CASELLA, I.G.; & GATTA, M. Determination of aliphatic organic acids by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, p.23-28, 2002.

CASTINEIRA, A.; PEÑA, R.M.; HERRERO, C.; MARTIN, S.G. Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: Optimization with five different background electrolytes, **HRC-Journal of High Resolution Chromatography**. v.23, p.319-331, 2000.

CASTINEIRA, A.; PEÑA, R.M.; HERRERO, C.; MARTIN, S.G. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection, **Journal of Food Composition and Analysis**. v.15, p.319-331, 2002.

CHENG, Y.; YUAN, H. A simple approach to the prediction of electrophoretic mobilities of diverse organic acids, **Analytica Chimica Acta**. v.565, p.112-120, 2006.

CHOI, O.K.; JO, J.S. Determination of L – aa in Foods by Capillary Zone Electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.781, p.435-443, 1997.

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.

CORTE, E.; SALGADO, J.M. Estabilidade do ácido ascórbico em suco congelado de acerola (*Malpighia globra* L. – sinônimo de *M. punicifolia* L.) durante o armazenamento, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimento**. v.15, p.101-112, 1997.

CRASTON, D.H.; SAEED, M. Analysis of carboxylic and related acids in the environment by capillary electrophoretic techniques, **Journal of Chromatography A**. v.827, p.1-12, 1998.

DAVEY, M.W.; PERSIAU, G.; BAUW, G.; MONTAGU, M.V. Direct measurement of ascorbic acid biosynthesis in *arabidopsis* cell suspension culture using capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.853, p.381-389, 1999.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos, São Paulo, **Atheneu**. Segunda Edição. 2006. 652p.

FERNANDES, A.G.; PINHEIRO, A.M.; PRADO, G.M.; FAI, A.E.C.; SOUZA, P.H.M.; MAIA, G.A. Sucos tropicais de acerola, goiaba e manga: Avaliação dos padrões de identidade e qualidade, **Ceres**. V.53, n.307, p.302-308, 2006.

FUNG, Y.S.; TUNG, H-S. Application of capillary electrophoresis for organic acid analysis in herbal studies, **Electrophoresis**. v.22, p.2242-2250, 2001.

FUNG, Y.S.; LAU, K.M. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis, **Electrophoresis**. v.24, p.3224-3232, 2003.

FUKUSHI, K.; TAKEDA, S.; WAKIDA, S-I.; YAMANE, M.; HIGASHI, K.; HIIRO, K. Determination of ascorbic acid in vegetables by capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.772, p.313-320, 1997.

GALLI, V.; GARCIA A.; SAAVEDRA L.; BARBAS C. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples, **Electrophoresis**. v.24, p.1951-1981, 2003.

GALLI, V.; BARBAS, C.; Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids with indirect detection, **Journal of Chromatography A**. v.1032, p.299-304, 2004.

HARRIS, D.C. Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro, **LTC Sétima Edição**. 2008. 868p.

HERNANDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ M. Determination of vitamin C in tropical fruits. A comparative evaluation of methods, **Food Chemistry**. v.96, p.654-664, 2006.

HERNANDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZALES, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple, **Food Chemistry**. v.114, p.734-741, 2009.

HORIE, H.; YAMAUCHI, Y.; KOHATA, K. Analysis of organic anions in tea infusion using capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.817, p.139-144, 1998.

HSIEH, M-M.; CHANG, H-T. Dynamic control for the separation of organic acids in capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.793, p.145-152, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003. 35p.

IUPAC – Analytical methods committee, recommendations for the definitions, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112 (1987) 199.

JARGER, 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.

JUSTI, K.C.; VISENTAINER, V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dúbia*), **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v.50, n.4, p.405-408, 2000.

KLAMPFL, C.W.; BUCHBERGER, W.; HADDAD, P.R. Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.881, p.357-364, 2000.

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

LANDERS, J.P. Handbook of Capillary Electrophoresis. Florida: **CRC Press**, 1997. 894p.

LEHNINGER; LESTER, B. A. Bioquímica Volume 1, **Edgard Blucher**, 8ª Reimpressão. 2004.

LEITE, F. Validação em Análise Química. Campinas, **Editores Átomo**, 1998. 224p.

LINDEBERG, J. Capillary electrophoresis in food analysis, **Food Chemistry**. v.55, n.1, p.73-94, 1996.

LUYKX, D.M.A.M.; and VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products, **Food Chemistry**. v.107, p.897-911, 2008.

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

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

MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A.P.; GINÉ, M.F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): Desafios, aplicações e perspectivas, **Química Nova**. v.25, n.3, p.412-419, 2002.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A. Bioquímica uma Abordagem Dirigida por Casos, São Paulo, **Martins Médicas**. 5ª ed. 1994. 477p.

OLSSON, J.; NORDSTROM, O.; NORDSTROM, A.-C.; KARLBERG, B. Determination of ascorbic acid in isolated pea plant cells by capillary electrophoresis and amperometric detection, **Journal of Chromatography A**. v.826, p.227-233, 1998.

PEREZ-RUÍZ, T.; MARTINEZ-LUZANO, C.; TOMÁS, V.; & MARTIN, J. High-performance liquid chromatography separation of citric, lactic, malic, oxalic, and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection, **Journal of Chromatography A**. v.1026, p.56-64, 2004.

PERES, R.G.; MORAES, E.P.; MICKE, G.A.; TONIN, F.G.; TAVARES, M.F.M.; AMAYA, D.B.R. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection, **Food Control**. v.20, p.548-552, 2009.

QUIRÓS, A.R-B.; FERNANDEZ-ARIAS, M.; LÓPES-HERNANDEZ, J. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks, **Food Chemistry**. v.116, p.509-512, 2009.

RIBANI, M.; BOTTODI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**. v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIVASSEAU, C.; BOISSON, A-M.; MONGÉLARD, G.; COURAM, G.; BASTIEN, O.; BLIGNY, R. Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection directed metabolic analyses during metal stress, **Journal of Chromatography A**. v.1129, p.283-290, 2006.

RONCADA, M.J.; WILSON, D.; SUGUIMOTO, L. Concentração de ácido ascórbico em sucos de diversas frutas brasileiras e sua relação com preço e necessidade diárias recomendadas de vitamina c, **Revista Saúde Pública**. v.11, p.39-46, 1977.

SAAD, B.; BARI, M.F.; SALCH, M.I.; AHMAD, K.; MOHD, K.; TALIB. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**. v.1073, p.393-397, 2005.

SAAVEDRA, L.; GARCIA, A.; BARBAS, C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers en orange juice, **Journal of Chromatography A**. v.881, p.395-401, 2000.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages, **LWT**. v.40, p.1741-1746, 2007.

SARMINI, K.; KENNDLER, E. Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.792, p.3-11, 1997.

SCHERER, R.; RYBKA, A.C.P.; GODOY, H.T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açai e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju, **Química Nova**. v.15, n.0, p.1-4, 2008.

SCHIEWE, J.; MRESTANI, Y.; NEUBERT, R. Application and optimization of capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.717, p.255-259, 1995.

SILVA, J.A.F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar, **Química Nova**. v.26, n.1, p.56-64, 2003.

SILVA, M.R.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, J.S. Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos de caju-do-cerrado refrigerados e congelados, **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.34, n.1, p.9-14, 2004.

SOYER, Y.; KOCA, N.; & KARADENIZ, F. Organic acids profile of Turkish white grapes and grape juices, **Journal of Food Composition and Analysis**. v.16 p.629-636, 2003.

SOGA, T.; ROSS, G A. Simultaneous determination of inorganic anion, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v.834, p.65-71, 1999.

STAMPA, S.E. Nutrição Relacionada ao Diagnóstico e Tratamento, **Manoele**. Quinta edição, 2007.

SUAREZ, M.H.; RODRIGUEZ, E.R.; ROMERO, C.D. Analysis of organic acid in cultivars of tomato harvested in Tenerife, **European Food Research and Technology**. v.226, p.423-435, 2008.

TANG, Y.; WU, M. The simultaneous separation and determination of five organics acids in food by capillary electrophoresis, **Food Chemistry**. v.103, p.243-248, 2007.

TAPIA, H.J.Q. Alimentos Funcionales, Aspectos Bioquímicos y de Procesado. **Editorial ACRIBIA S.A**, 2000.

TAVARES, J.T.Q.; SILVA, C.L.; CARVALHO, L.A.; SILVA, M.A.S.; SANTOS, C.M.G. Estabilidade do ácido ascórbico em sucos de laranja submetido a diferentes tratamentos, **Magistra**. v.12, n.1/2, p.835-839, 2000.

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

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

TREVASKIS, M.; & TRENERRY, V.C. An investigation into the determination of oxalic acid in vegetable by capillary electrophoresis, **Food Chemistry**. v.57, n.2, p.323-330, 1995.

VICKERS, P.J.; BRAYBROOK, J.; LAWRENCE, P.; GRAY, K. Detecting tartrate additives in foods: Evaluating the use of capillary electrophoresis, **Journal of Food Composition and Analysis**. v.20, p.252-256, 2007.

VIGNOLI, J.A.; BASSOLI, D.G. Determinação de ácidos carboxílicos e fenólicos em café solúvel utilizando HPLC/DAD, **Revista Analytica**. n.27, p.76-79, 2007.

VORARAT, S.; AROMDEE, C.; PODOKMAI, Y. Determination of alpha hydroxy acids in fruit by capillary electrophoresis, **Analytical Science**. v.18, p.893-896, 2002.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X-Q.; LIN, J.M. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection, **Journal of Chromatography A**. v.989, p.285-292, 2003.

WEINBERGER, R. Practical Capillary Electrophoresis. **Academia Press**, 2000.

WU, C.H.; LO, Y.S.; LEE, Y.H.; LIN, T.I. Capillary electrophoresis determination of organics acids with indirect detection, **Journal of Chromatography A**. v.716, p.291-301, 1995.

WU, T.; GUAN, Y.; YE, J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection, **Food Chemistry**. V.100, p.1573-1579, 2007.

XU, J.; CHEN, Z.; YU, J.C.; TANG, C. Simultaneous determination of inorganic anions, carboxylic acids by capillary zone electrophoresis with direct UV detection, **Journal of Chromatography A**. v.942, p.289-294, 2002.

YANG, W.C.; YU, A.M.; DAI, Y.Q.; CHEN, H.Y. Separation and determination of di-and tricarboxylic acids in fruits by capillary zone electrophoresis with amperometric detection, **Analytica Chimica Acta**. v. 415, p.75-81, 2000.

11. ANEXOS

ANEXO A

CURRICULUM VITAE

Nome: José Marcos Valentim de Carvalho

Nascimento: 11 de novembro de 1981 em Lagarto/SE

Filiação: João Valentim de Carvalho e Josefa Jovelina Nascimento de Carvalho

FORMAÇÃO

- ❖ Graduação: Licenciado em Química pela Universidade Federal de Sergipe.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- ❖ De 2005 a 2007, atuou como analista químico no controle de qualidade da empresa de alimentos e fermentados acéticos Maratá Aguardentes, exercendo atividades espectrofotométrica, turbidimétrica, titulométrica, e cromatografia gasosa (GC).
- ❖ Desde 2007 exerce atividades ligadas à educação em Química, em diversos estabelecimentos particulares e público de ensino.
- ❖ Desde 2007 atua como professor efetivo de Química na Escola prof. Abelardo Romero Dantas Lagarto/SE.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

- ❖ 2008 – Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão) 4º encontro da Pós-Graduação em Química. Apresentação do trabalho “Análise de Ácidos Orgânicos em Frutas Utilizando Eletroforese Capilar”.
- ❖ 2009 – Universidade Federal de Sergipe (Campus Prof. Alberto Carvalho) I ENESQUIM. Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de um Sistema Eletroforético para Determinação de Ácidos Orgânicos em Sucos de Frutas Utilizando Eletroforese Capilar de Zona”.
- ❖ 2009 – Bahia Othon Palace Hotel (Salvador – BA) – 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica.

- ❖ 2009 – Bahia Othon Palace Hotel (Salvador – BA) – 15° Encontro Nacional de Química Analítica e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica. Curso: Análise Multivariada.
- ❖ 2009 – Bahia Othon Palace Hotel (Salvador – BA) – 15° Encontro Nacional de Química Analítica e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica. Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de um Sistema Eletroforético para Determinação de Ácidos Orgânicos em Sucos de Frutas”.
- ❖ 2010 – Submissão do artigo intitulado “Developing of a System for the Determination of Organic Acids in Fruit Juices Using Capillary Zone Electrophoresis”. no Journal Food of Composition Analysis, em 28 de janeiro de 2010.

ANEXO B

Tabela 2 – Aditivos de eletrólitos comumente empregados em eletroforese capilar. FONTE: TAVARES M FM, 1997.

ADITIVO	FUNÇÃO E/OU EFEITO
Ácidos sulfônicos	Agente de pareamento iônico e modificador da carga superficial
Aminas	Bloqueia sítio ativo na superfície capilar. Reduz a adsorção e a simetria de pico
Linfólitos	Reduz a interação soluto capilar, melhora a resolução e simetria de pico
Ciclodextrinas	Usado na separação quiral e como complexante auxiliar na separação de compostos nêutros
Éter coroa	Usados nas separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de metais
Glicóis	Reduz a adsorção soluto-capilar, auxilia na solubilidade de solutos orgânicos e reduz o fluxo eletrosmótico.
Metais de transição	Modificam a mobilidade de certos solutos, afetam a resolução
Polímeros de celulose	Agentes modificadores do fluxo-eletrosmótico
Sais inorgânicos	Reduz o fluxo eletrosmótico, altera a conformação de proteínas e previne a adsorção soluto capilar
Solventes orgânicos	Aumenta a solubilidade de solutos orgânicos. Reduz a interação soluto/capilar. Agentes modificadores do fluxo eletrosmótico
Tensoativos catiônicos	Reverte o fluxo eletrosmótico
Uréia	Aumenta a solubilidade das proteínas