UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

TATIANA SHIZUE FUKUJI

PROPOSTAS METODOLÓGICAS PARA COMPONENTES EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS, ALIMENTOS ENRIQUECIDOS E CONTAMINANTES UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DETECÇÃO UV/VIS

Versão Corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
05/12/2011

TATIANA SHIZUE FUKUJI

PROPOSTAS METODOLÓGICAS PARA COMPONENTES EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS, ALIMENTOS ENRIQUECIDOS E CONTAMINANTES UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DETECÇÃO UV/VIS

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Programa de Química)

Orientadora: Profa. Dra.Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2011

“Propostas metodológicas para componentes em matrizes alimentícias, alimentos enriquecidos e contaminantes utilizando eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas e detecção UV/Vis”

TATIANA SHIZUE FUKUJI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

_____

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
Orientadora e Presidente

_____

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
IQ – USP

_____

Prof. Dr. Jorge Cesar Masini
IQ – USP

_____

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de oliveira
UFJF

_____

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA - UNICAMP

SÃO PAULO
20 de dezembro de 2011

Dedicatórias

Aos meus pais, que tanto me apoiaram e se dedicaram pela minha vida e formação.

A minha nova família, que estou constituindo.

AGRADECIMENTO(S)

À Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares pela orientação, pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade oferecida de aprendizado e crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Alejandro Cifuentes, pela orientação em parte deste trabalho e pela valiosa oportunidade em adquirir conhecimentos de CE-MS e pelo acolhimento afetuoso em seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin pela co-orientação e ensinamentos prestados no início do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, pelos ensinamentos em estatística.

Ao meu companheiro Carlos, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo. Sua presença foi muito importante nos momentos difíceis.

Aos grandes amigos André, Claudinei, Viviane e Virgínia pela confiança, ajuda e por todos os momentos alegres divididos.

Aos amigos do laboratório, Aline Klassen, Aline Vitor, Daniel Oliveira, Daniel, Edgar, Gisele, Grazielle, Karina, Lucas, Maryane e Simone pela convivência, paciência e troca de experiências.

Pelas amizades antigas e adquiridas durante este período: Vanessa, Lígia, Thiago, Daiana, Renata Pires, Renata Fogaça, Carlos Eduardo, Carlos William, Eduardo, James, Giovana, Lya, Raquel, Aline.

Aos amigos adquiridos na Espanha pela troca de experiência e contato com culturas de diferentes países.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e sua equipe pelo auxílio.

A todos os professores da USP que contribuíram para minha formação acadêmica.

A todos os funcionários da secretaria de pós-graduação.

À Fapesp e CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus, por todos os acontecimentos importantes em minha vida.

Nossa maior fraqueza está em desistir.
O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.

Thomas A. Edison

RESUMO

Fukuji, T.S. **Propostas Metodológicas para componentes em matrizes alimentícias, alimentos enriquecidos e contaminantes utilizando eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas e detecção UV/Vis**. 2011. 164p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O trabalho envolve o desenvolvimento de métodos para análise de alimentos visando a determinação de ácidos fenólicos em frutas, ácido fólico em farinhas enriquecidas e corantes Sudan em produtos de pimenta utilizando eletroforese capilar nos modos de detecção UV e MS. A separação de dez ácidos fenólicos (ácidos clorogênico, siríngico, *p*-cumárico, benzóico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico, vanílico, cafeico, gálico e protocatecuico) foi obtida por eletroforese capilar de zona (CZE). Um eletrólito composto de 50 mmol L^{-1} de tetraborato e 7,5% metanol (v/v) permitiu a separação em linha de base dos dez ácidos fenólicos em menos de 15 minutos. A fim de promover o "clean-up", pré-concentração e liberação dos ácidos fenólicos esterificados, um procedimento de extração líquido-líquido seguido pela hidrólise alcalina foi realizado. O método foi validado obtendo-se limites de detecção de 1,63-3,80 µg mL^{-1} e limites de quantificação de 4,95-11,39 µg mL^{-1}. O método otimizado foi aplicado para análise de frutas como a abiu-roxo (*Chrysophyllum caimito*), amora silvestre (*Morus nigra* L.) e tomate de árvore (*Cyphomandra betacea*), identificando os ácidos fenólicos na fração livre e hidrolisada. Este trabalho também otimizou o processo de extração e caracterizou a composição de ácidos fenólicos na forma livre e hidrolisada presentes no açaí Juçara (*Euterpe precatória* Mart.), açaí do Pará (*Euterpe oleracea*) e em produtos comercias de açaí como polpa congelada e "açaí na tigela". Para a determinação do ácido fólico, estudos de pré-concentração *online* foram realizados. A focalização do ácido fólico foi obtida por CZE e MEKC, devido a fenômenos de isotacoforese transiente. Um método de extração simples baseado na dissolução da farinha em solução de Na_2HPO_4 seguida de ultrassom e adição de HCl concentrado foi adotado. Entretanto, a detecção do ácido fólico no extrato foi obtida por MEKC com injeção de grande volume de amostra em condições eletroforéticas de 40 mmol L^{-1} TBS e 30 mmol L^{-1} SDS, 15 kV a 310 nm. Os limites de detecção e de quantificação atingidos foram de 0,047 e 0,14 µg mL^{-1}, sendo adequados para

quantificação do ácido fólico em farinhas de trigo. Um método para determinação de corantes Sudan (I, II, III e IV) em alimentos foi desenvolvido por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) com preenchimento parcial do capilar. A separação dos quatro corantes foi obtida utilizando-se um preenchimento de 25% do capilar (volume total) com eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5% ACN (v/v). O restante do capilar foi preenchido com um tampão composto de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% (v/v) de ACN. Após otimização do método por CE-UV o método foi aplicado para o acoplamento ao CE-MS. Para detecção dos compostos no MS os parâmetros de ionização foram otimizados. A separação em linha de base dos quatro compostos foi obtida em menos de 10 min com limites de detecção de 0,57 a 0,75 µg mL^{-1} para detecção no UV-Vis e 0,05 a 0,2 µg mL^{-1} para detecção no MS. O método foi eficaz para a determinação destes corantes adicionados a amostras de molho de tomate e pimenta e *chilli* em pó.

Palavras-chave: Eletroforese capilar, alimentos, ácidos fenólicos, ácido fólico e corante Sudan.

ABSTRACT

Fukuji, T.S. **Methodological proposals for food matrix components, enriched foods and contaminants using capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry and UV/Vis detection**. 2011. 164p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present work involves the development of methods for food analysis in order to determinate phenolic acids in fruits, folic acid in enriched flour and Sudan dye in chilli products by capillary electrophoresis with UV/Vis and MS detection. The separation of ten phenolic acids (benzoic, caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric, ferulic, gallic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, syringic, and vanillic acid) was obtained by capillary zone electrophoresis (CZE). An electrolyte composed by 50 mmol L^{-1} of tetraborate and 7,5% methanol (v/v) allowed the baseline resolution of all phenolic acids under investigation in less than 15 min. In order to promote sample clean up, to preconcentrate the phenolic fraction and to release esterified phenolic acids from the fruit matrix, elaborate liquid-liquid extraction procedures followed by alkaline hydrolysis were performed. The proposed method was validated with limits of detection of 1.63-3.80 µg mL^{-1} and limits of quantification of 4.95-11.39 µg mL^{-1}. The optimized method was applied to evaluation of phenolic contents of abiu-roxo (*Chrysophyllum caimito*), wild mulberry (*Morus nigra* L.) and tree tomato (*Cyphomandra betacea*). This work also optimized the extraction process and characterized the free and hydrolysed forms of phenolic acids in Juçara açaí (*Euterpe precatória* Mart.), Pará´s açaí (*Euterpe oleracea*) and commercial products such as frozen pulp and açaí desserts. For the determination of folic acid, on-line preconcentration studies were performed. The focalization of folic acid was obtained by CZE and MEKC by transient isotacophoresis. A simple method of extraction based on dissolution of flour in a Na_2HPO_4 solution followed by ultrasonication and the addition of concentrated HCl was adopted. However, the detection of folic acid in flour extract was obtained by MEKC with the large volume sample injection with eletrophoretic conditions of 40 mmol L^{-1} TBS and 30 mmol L^{-1} SDS, 15 kV and 310 nm. The limits of detection and quantification reached were 0.047 and 0.14 µg mL^{-1}, which are suitable limits to quantify folic acid in enriched wheat

flours. A method of Sudan dyes (I, II, III and IV) was developed by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with partial filling technique. Filling 25 % of the capillary with a MEKC solution containing 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS and 32.5 % ACN (v/v), a baseline separation of the four azo-dyes was obtained. The rest of capillary was filled with 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 and 32.5 % ACN (v/v). After the optimization by CE-UV the method was applied to CE-MS coupling. To detect the compounds in MS the ionization parameters were optimized. The baseline separation of four compounds was obtained in less than 10 min with limit of detection within 0.57 to 0.75 µg mL^{-1} to UV-Vis detection and 0.05 to 0.2 µg mL^{-1} to MS detection. The method was efficient in the determination of these dyes spiked in tomato chilli sauces and chilli powder.

Keywords: capillary electrophoresis, food, phenolic acids, folic acid and Sudan dyes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Do inglês *Association of Analytical Communities*
BGE	Eletrólito de corrida, do inglês *background electrolyte*
BPE	Eletroferograma pico-base, do inglês *base peak electropherogram*
CE	Eletroforese Capilar, do inglês *capillary electrophoresis*
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas, do inglês *capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry*
CE-UV	Eletroforese capilar acoplada ao detector ultravioleta, do inglês *capillary electrophoresis coupled to Ultraviolet*
CGE	Eletroforese capilar em gel, do inglês *capillary gel electrophoresis*
CIEF	Focalização isoelétrica capilar, do inglês *capillary isoeletric focusing*
CITP	Isotacoforese capilar, do inglês *capillary isotachophoresis*
c.t.	Comprimento total
C.V.	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona, do inglês *capillary zone eletrophoresis*
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
d.i.	Diâmetro interno
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ECLAMC	Estudo latino-americano colaborativo de malformações congênitas
EIE	Eletroforerograma do íon extraído, do inglês *extracted íon electropherogram*
EP	Erro padrão
ESI	Do inglês *electrospray*
F	Valor F de Fisher
FAO	Do inglês *food and agricultural organization*
FDA	Do inglês *food and drug administration*
FID	Detector de ionização por chama, do inglês *flame ionization*

	detector
GC	Cromatografia gasosa, do ingles *gas chromatography*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
IT	Armadilha de íons, do inglês *ion trap*
IARC	Do inglês International Agency for Research on Cancer
LC	Cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*
LD	Limite de detecção
LIF	Fluorescência induzida por laser, do inglês *laser induced fluorescence*
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MEEK	Cromatografia Eletrocinética em Microemulsão, do inglês *microemulsion electrokinetic chromatography*
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês *micellar electrokinetic chromatography*
MS	Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
MS/MS	Espectrometria de massa sequencial
m/z	Razão massa-carga, do inglês *mass-to-charge ratio*
NMR	Ressonância magnética nuclear, do inglês *Nuclear magnetic resonance*
ODS	octadecilsilil
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade
$R_{i, ii}$	Resolução entre os picos i e ii
R^2	Coeficiente de correlação
R^2 aj	Coeficiente de correlação ajustado
PF	Preenchimento parcial, do inglês *partial filling*
PF-MEKC	Preenchimento parcial do capilar com Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês *partial filling with micellar electrokinetic*

	chromatography
RF-MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar com fluxo revertido, do inglês *reversed-flow micellar electrokinetic chromatography*
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*
SLE	Extração sólido-líquido, do inglês *solid liquid extraction*
SPE	Extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*
TBS	Tetraborato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
tITP	Isotacoforese transiente, do inglês *transient isotachophoresis*
TLC	Cromatografia em camada fina, do inglês *thin layer chromatography*
UV	Ultra violeta
Vis	Visível
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*
μ	mobilidade

Sumário

CAPÍTULO 1 17
1. Introdução 17
1.1 Eletroforese Capilar e seu acoplamento à Espectrometria de massas 17
1.2 Eletroforese capilar na análise de alimentos 22
1.2.1 Compostos fenólicos 24
1.2.2 Vitaminas 28
1.2.3 Contaminantes de alimentos 30
Referências Bibliográficas 34

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM FRUTAS NATIVAS POR ELETROFORESE CAPILAR 38
Resumo 38
1. Introdução 39
2. Materiais e método 43
2.1 Reagentes 43
2.2 Instrumentação 43
2.3 Preparo das amostras e método de extração 44
3. Resultados e discussões 46
3.1 Otimização 46
3.2 Validação 61
3.3 Determinação dos ácidos fenólicos em frutas nativas 66
4. Conclusões 72
Referências Bibliográficas 73

CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS NO FRUTO DO AÇAÍ E PRODUTOS DERIVADOS POR ELETROFORESE CAPILAR 78
Resumo 78
1. Introdução 79
2. Materiais e método 82
2.1 Reagentes 82
2.2 Instrumentação 82
2.3 Preparo das amostras e método de extração 83
3. Resultados e discussões 86
4. Conclusões 103
Referências Bibliográficas 104

CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA POR ELETROFORESE CAPILAR 107
Resumo 107
1. Introdução 108
2. Materiais e método 113
2.1 Reagentes 113
2.2 Instrumentação 113
2.3 Preparo das amostras e método de extração 114

3. Resultados e discussões 115
4. Conclusões 130
Referências Bibliográficas 131

CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DE CORANTES SUDAN I-IV EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR COM PREENCIMENTO PARCIAL DO CAPILAR COM DETECÇÃO UV E MS 134
Resumo 134
1. Introdução 135
2. Materiais e método 139
2.1 Reagentes 139
2.2 Preparo das amostra 140
2.3 Condições instrumentais CE-UV 141
2.4 Condições instrumentais CE-MS 142
3. Resultados e discussões 144
3.1 Desenvolvimento de método de separação dos corantes azo por PF-MEKC-UV 144
3.1.1 Aplicação do método PF-MEKC UV em amostras reais 156
3.2. Desenvolvimento de método de separação dos corantes azo por PF-MEKC-MS 158
3.2.1 Aplicação em amostras reais 165
4. Conclusões 167
Referências Bibliográficas 168

Súmula Curricular 171

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eletroforese Capilar e seu acoplamento à Espectrometria de Massas

As técnicas de eletromigração em capilares são baseadas na migração diferencial de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico. Vários modos de separação são possíveis, com mecanismos singulares e seletividade característica. Neste trabalho, o termo eletroforese capilar (CE) é utilizado como termo coletivo para todas as técnicas de eletromigração em capilar. De acordo com as normas oficiais, a sigla CE é destinada à nomenclatura do modo de eletroforese capilar em zona, ou em solução livre (Silva *et al.*, 2007), entretanto, o termo CE tem sido comumente utilizado como termo genérico de todas as técnicas de eletromigração, mesmo nas publicações mais recentes.

Em eletroforese capilar, a separação é conduzida em tubos de dimensões capilares, com 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc.). A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), resultando em separações de alta eficiência, resolução inigualável e tempos de análise relativamente curtos (Tavares, 1996b). Outra vantagem é o baixo custo operacional: mesmo em condições em que se empregam solventes orgânicos, os volumes

consumidos de amostra e eletrólito são desprezíveis comparados à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os modos de separação mais utilizados em CE são: Eletroforese capilar em zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoelétrica capilar (CIEF) e isotacoforese capilar (CITP). No presente trabalho, os modos de interesse foram CZE e MEKC. Em CZE, por exemplo, a separação é baseada nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas, em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos. Estes podem conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas, com intuito de melhorar a seletividade ou eficiência do método. Já em MEKC a separação simultânea de compostos neutros e iônicos é possível devido à migração diferenciada promovida pela interação dos analitos em meio micelar (Baker, 1995; Tavares, 1996a).

Para se obter uma boa separação em CE, é necessário otimizar vários parâmetros como: o tipo de eletrólito, pH e concentração; tipo e dimensões do capilar; uso de aditivos (tipo e concentração), temperatura, voltagem; modo de injeção, etc. A influência de todos os parâmetros dependerá da do modo de separação utilizado, da espécie de analitos a serem estudados e da matriz a ser analisada. O desenvolvimento de um método por CE envolve a manipulação e conhecimento de diferentes parâmetros, entretanto, apresenta diversas estratégias para a separação de uma ampla gama de compostos químicos. Assim, a maior contribuição que a CE oferece é complementaridade às técnicas já estabelecidas na análise de alimentos, como HPLC e cromatografia gasosa (GC), devido à grande versatilidade na geração de diferentes métodos.

Diferentes modos de detecção têm sido utilizados em CE como absorção no UV-Visível, fluorescência induzida a laser (LIF), métodos eletroquímicos, condutividade, e espectrometria de massas (MS) (Cifuentes, 2006).

A eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (CE-MS) é uma técnica recente que tem sido aplicada em diversas áreas de interesse, como análise de alimentos, sistemas biológicos e diagnósticos clínicos (Simo *et al.*, 2005; Pantuckova *et al.*, 2009). O uso desta técnica na análise de alimentos, assim como em outras áreas, oferece importante vantagem devido à combinação da grande capacidade de separação da CE, ou seja, alta seletividade com a alta especificidade e sensibilidade do MS em identificar e caracterizar diversos compostos simultaneamente.

Do ponto de vista instrumental e operacional, a principal limitação do acoplamento CE-MS foi a compatibilidade da fase líquida da técnica de CE com a fase gasosa da técnica de MS. Nos últimos anos, avanços consideráveis foram introduzidos na interface CE-MS para facilitar a transferência dos analitos da fase líquida para a detecção na fase gasosa no MS. Apesar do grande número de técnicas de ionização disponíveis, a principal interface usada para o acoplamento do CE ao MS tem sido o eletrospray (ESI). A ionização por ESI envolve a formação de um spray eletrostático, a partir do qual são geradas gotículas carregadas e destas são liberados os íons na fase gasosa (Pantuckova *et al.*, 2011).

Em CE-ESI-MS a interface deve promover tanto uma corrente estável do sistema CE quanto uma boa eficiência de ionização. Para isto, o circuito elétrico do CE deve ser fechado na interface considerando-se a baixa velocidade do fluxo e a natureza do eletrólito de separação. A interface com líquido auxiliar coaxial é a modalidade de conexão mais utilizada em CE-ESI-MS devido à sua fácil construção,

estabilidade e reprodutibilidade (Assunção *et al.*, 2008). Neste tipo de interface, um líquido de composição volátil, denominado de líquido auxiliar, é introduzido através de um tubo de aço inoxidável e concêntrico ao capilar eletroforético, onde a mistura com o efluente eletroforético ocorre na extremidade do tubo (Figura 1). Este líquido auxiliar aumenta o fluxo na saída do capilar promovendo a formação de um eletrospray estável. O circuito elétrico pode ser fechado pelo aterramento do capilar metálico (agulha) do eletrospray. Apesar da diluição dos solutos devido ao líquido adicional e conseqüente diminuição da sensibilidade, este modelo de interface apresenta alta estabilidade, além de ser de fácil implementação e uso. Porém, a otimização de parâmetros eletroforéticos (como pH, concentração e natureza do tampão e do modo de ionização (natureza e concentração de solvente orgânico e aditivos, vazão do líquido auxiliar, gás nebulizador e temperatura) podem melhorar a sensibilidade para uso geral desta interface (Simo *et al.*, 2005; Assunção *et al.*, 2008).

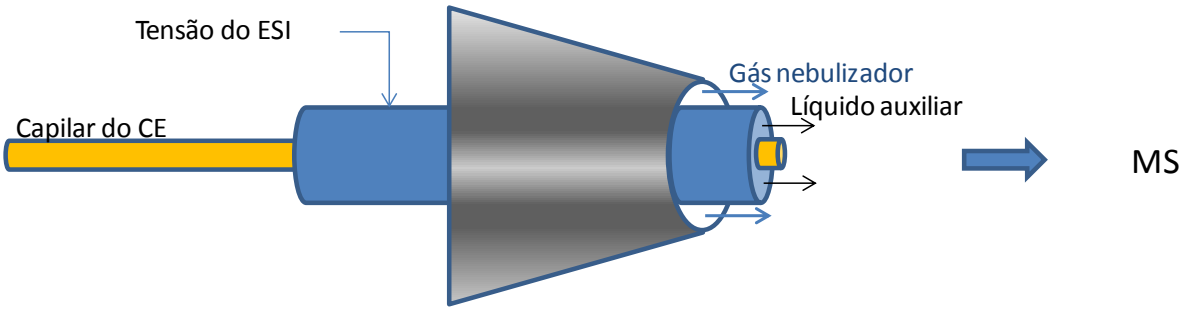


Figura 1. Interface para o acoplamento do CE e MS.

A Figura 2 ilustra uma interface CE-ESI-MS com líquido coaxial para o formato ortogonal em relação ao eixo de entrada do espectrômetro de massas. O uso deste tipo de interface reduz o risco de contaminação ou obstrução da entrada do MS e permite o uso de tampões eletroforéticos moderadamente não voláteis. Nesta interface, a agulha do ESI é aterrada e uma alta tensão é aplicada na entrada

do MS, para onde os íons são direcionados para devido à interação eletrostática. Assim, a probabilidade de apenas moléculas carregadas entrarem no MS é maior do que em interfaces lineares (Assunção *et al.*, 2008).

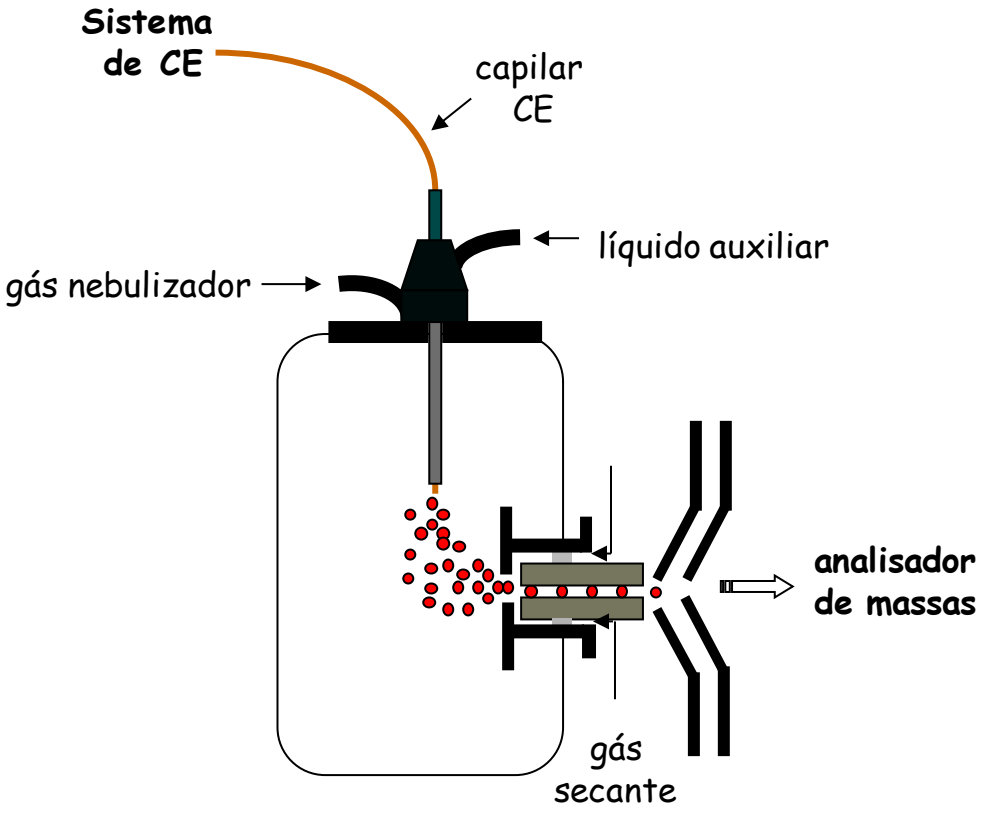


Figura 2. Interface CE-ESI-MS com líquido auxiliar ortogonal (Assunção *et al.*, 2008).

Em relação à composição do eletrólito utilizado em CE-MS, principalmente quando se utiliza a interface ESI, o sistema eletrólito deve ser volátil e de baixa força iônica. Devido a estas limitações, na prática, os eletrólitos mais utilizados são ácido acético, ácido fórmico e seus sais de amônio. Tampões contendo carbonato como ânion volátil e alquilaminas como cátions voláteis também são usados, mas com menor frequência. O uso de tampões não voláteis podem diminuir a detectabilidade dos analitos devido ao depósito de sais na agulha do eletrospray e diminuição da resposta analítica devido ao pareamento iônico com o analito (Krivankova *et al.*,

2009). Apesar desta limitação, diferentes estratégias podem ser empregadas na utilização de compostos não voláteis em eletrólitos para CE-MS.

Muitos dos surfactantes utilizados em MEKC e seletores quirais são exemplos de espécies não compatíveis com a detecção ESI-MS. A técnica de preenchimento parcial (PF – do inglês *partial filling*), desenvolvida por Terabe *et al*. (Ozaki *et al.*, 1995), permitiu o uso destes componentes incompatíveis com o ESI-MS permitindo a operação online de MEKC-ESI-MS e separações quirais utlizando aditivos não voláteis (Simo *et al.*, 2010). Em PF-MEKC, por exemplo, o capilar é primeiramente preenchido com o eletrólito volátil (compatível com MS), seguido pela introdução do eletrólito micelar e, finalmente, pela injeção da amostra. Após aplicação de tensão, os analitos se separam no eletrólito micelar de acordo com a natureza da interação soluto-micela e, então, migram para o eletrólito volátil, livre de tensoativo, seguindo em velocidade constante até o detector. A corrente é interrompida antes que o eletrólito micelar alcance o detector, evitando assim a sua contaminação (Muijselaar *et al.*, 1998).

1.2 Eletroforese capilar na análise de alimentos

Os alimentos são de grande importância para o homem, tanto em relação à saúde quanto ao aspecto socioeconômico. O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários alimentos, entre eles café, açúcar, suco de frutas, soja, carne bovina e frango. O agronegócio no Brasil tem importante participação na economia, em 2010 teve uma contribuição de 467,9 bilhões de dólares que corresponderam a 22,4% do produto interno bruto (CEPEA-USP/CNA, 2011). Trata-

se de um setor produtivo relevante envolvendo elos de várias cadeias produtivas da agricultura e pecuária.

A relação entre a alimentação e a saúde é bastante enfatizada. Atualmente o consumo e procura por alimentos saudáveis é cada vez maior. Os consumidores estão mais cautelosos em relação aos alimentos que apresentam riscos à saúde, como aqueles que contêm contaminantes cancerígenos. Muitas pesquisas estão voltadas para a investigação de alimentos funcionais e de substâncias que representam risco à saúde.

Tendências e demandas de consumidores, das indústrias de alimentos, institutos de pesquisa e órgãos governamentais requerem cada vez mais a pesquisa e aplicação de métodos analíticos na área de alimentos. A análise de alimentos atua em vários segmentos do controle de qualidade, permeando desde a aquisição de matéria-prima até a estocagem de alimentos processados. Também é muito utilizada para a caracterização de alimentos in natura, principalmente, alimentos novos e ainda desconhecidos como as frutas ou vegetais típicos de regiões menos exploradas como a Amazônica e o Nordeste brasileiro. Nos órgãos governamentais, a principal utilização de processos analíticos é na fiscalização da segurança alimentar, controle de qualidade dos produtos alimentícios e na padronização de novos produtos. Adicionalmente, o monitoramento de resíduos perigosos e controle de adulterações são fundamentais para a saúde dos consumidores além de controlar fraudes econômicas.

A complexidade e diversidade da composição química e bioquímica de alimentos geram uma grande demanda por técnicas que possam ser usadas na análise de seus componentes. Um método ideal de análise deve ser robusto, altamente seletivo e aplicável a uma grande variedade de matrizes. Diferentes

modos cromatográficos são freqüentemente utilizados como etapa final de análise que, normalmente, são precedidos por extensivo trabalho de extração, derivação, etc.

O potencial da eletroforese capilar para a aplicação na análise de alimentos é imenso. A eletroforese capilar em seus diversos modos oferece alta resolução e eficiência de separação. A combinação destas propriedades permite à eletroforese capilar separar componentes variados de amostras em uma única corrida. Estes fatores aliados à rapidez, facilidade de automação e baixo consumo de solventes fornecem a eletroforese capilar vantagem considerável sobre as técnicas tradicionais. Por esta razão, a eletroforese capilar tem sido introduzida como metodologia alternativa ou complementar ao HPLC e GC em diversas aplicações.

A eletroforese capilar oferece aplicação abrangente na área de alimentos. Vários artigos de revisão foram publicados demonstrando diversas aplicações para analisar diferentes classes de compostos de interesse como compostos fenólicos antioxidantes, aminoácidos, proteínas, peptídeos, ácidos orgânicos, íons inorgânicos, carboidratos, micronutrientes, aditivos, contaminantes e resíduos (Simo *et al.*, 2005; Cifuentes, 2006; Boyce, 2007; Garcia-Canas e Cifuentes, 2007; Ravelo-Perez *et al.*, 2009; Herrero *et al.*, 2010; Vallejo-Cordoba e Gonzalez-Cordova, 2010; Pinero *et al.*, 2011). Alguns exemplos são citados a seguir:

1.2.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento destas e em resposta às condições de stress como infecção, ferimento, radiação UV, dentre outras. Os compostos fenólicos estão

presentes em alimentos de origem vegetal, sua presença contribui para a estabilidade oxidativa e características organolépticas como cor, aroma, adstringência, amargor, etc.

Vários compostos fenólicos são considerados antioxidantes devido ao fato destes compostos terem a capacidade de proteger células e biomacromoléculas neutralizando radicais livres, desta forma, prevenindo a degradação oxidativa e certas doenças humanas (câncer, distúrbios inflamatórios, degenerações neurológicas, doenças coronárias, etc.) (Crozier *et al.*, 2009). Os efeitos benéficos das frutas e verduras à saúde são devidos predominantemente às propriedades antioxidantes. Fontes de tocoferóis, carotenóides e ácido ascórbico são bem conhecidos e existe um grande número de publicações relacionadas à sua ação benéfica ao organismo humano. Entretanto, o mecanismo de ação dos fenólicos de plantas não foi completamente estudado devido à complexidade de sua natureza química, ampla ocorrência em plantas e ação no organismo (Shahidi e Naczk, 2004; Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010).

A determinação desta família de compostos é relevante porque a sua presença em alimentos evidencia seu valor funcional devido aos efeitos benéficos relacionados à saúde. Como descrito anteriormente, a eletroforese capilar apresenta muitas vantagens como técnica de separação. Uma quantidade considerável de trabalhos envolvendo a determinação de compostos fenólicos em plantas e derivados por CE foram publicados e compilados em artigos de revisão (Robbins, 2003; Herrero *et al.*, 2005; Jac *et al.*, 2006; Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010). Diversos modos de separação foram utilizados, no entanto, os modos CZE e MEKC são os mais empregados devido à versatilidade e simplicidade na composição de

eletrólito. A tabela a seguir demonstra alguns exemplos de aplicações por métodos de eletromigração em diferentes matrizes de alimentos.

Tabela 1. Alguns exemplos de aplicações de métodos para a determinação de compostos fenólicos por CE.

Amostra	Compostos detectados	Preparo de amostra	Modo de CE e detecção	Composição de eletrólito	Referencias
Brócolis, couve de Bruxelas, repolho e couve-flor	Ácidos cafeico, p-cumárico, ferúlico e sinápico	SPE	CZE- DAD (320 nm)	15 mmol L^{-1} borato, pH 9,13	(Lee *et al.*, 2011)
Vinho	Epicatequina, catequina, miricetina e quercetina	LLE	CZE –UV (205 nm)	50 mmol L^{-1} tetraborato de sódio, 10 mmol L^{-1} fosfato de sódio dibásico, pH 9,6	(Nicolaou e Kapnissi-Christodoulou, 2010)
Extrato de casca de laranja	Narinenina, narirutina, neohespedridina, hesperidina.	SLE	CZE - MS	200 ác. bórico + hidróxido de amônio, pH 9,5	(Sawalha *et al.*, 2009)
“Berries”	Trans-resveratrol, quercetina, morina e ácidos cinâmico, ferúlico e *p*-cumárico	SLE e SPE	CZE –UV (210 nm)	35 mmol L^{-1} tetraborato de sódio, pH 9,3,	(Ehala *et al.*, 2005)
Uva, maçã, chá, vinho tinto	(+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, ácidos caféico e gálico.	SLE	MEEK – UV (200 nm)	1,36% heptano p/v, 2,89% SDS p/v, 7,66 ciclohexanol p/v, 2% ACN p/v, 86,1% tampão fosfato pH 2,0 (25 mmol L^{-1}) v/v	(Huang e Lien, 2005)
Chá verde	Catequina, epicatequina, epigalocatequina, epigalocatequinagalato	Infusão com água quente e filtração	RF-MEKC (210 nm)	0,2% TEA, 50 mmol L^{-1} SDS, 0,8% s-β-CD, pH 2,9	(Rodriguez-Amaya *et al.*, 2011)

1.2.2 Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos de natureza e composição diferentes, presentes nos alimentos e são micronutrientes essenciais para o metabolismo dos organismos vivos. Estes compostos apresentam diferentes funções bioquímicas no organismo. Algumas delas são precursores de hormônios responsáveis pela regulação do metabolismo de minerais, como a vitamina D. As vitaminas A, C e E têm sido evidenciadas por atuarem como antioxidantes. A maior parte das vitaminas (vitaminas complexo B) atua como co-fatores de enzimas, desempenhando a função de coenzimas. As vitaminas são classificadas de acordo com sua solubilidade, pois esta propriedade influencia o modo de absorção, transporte e armazenamento. As vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) são absorvidas junto às gorduras sendo acumuladas no organismo e podendo alcançar níveis tóxicos. Já as vitaminas hidrossolúveis, consistem nas vitaminas do complexo B e C. Estas não são armazenadas em altas doses no organismo sendo necessária a reposição diária destas vitaminas (Penteado, 2003).

A maior parte das vitaminas são lábeis a mudanças de pH, temperatura e armazenamento prolongado, portanto, os alimentos industrializados apresentam baixo teor de vitaminas. Para compensar esta perda e assegurar níveis adequados de consumo diário de vitaminas, muitos alimentos enriquecidos estão disponíveis no mercado.

O desenvolvimento analítico para esta classe de compostos envolve análises de controle de qualidade, verificação das dosagens estipuladas em rótulos de alimentos e estudos de biodisponibilidade, estabilidade e outros interesses. Apesar do grande número de publicações de métodos analíticos avançados para determinação de vitaminas em alimentos, muitos dos métodos oficiais estão

ultrapassados e nem todos os métodos são aplicáveis a diferentes tipos de matrizes alimentícias. Os diferentes métodos utilizados envolvem ensaios microbiológicos, métodos bioespecíficos (imunoensaios) e técnicas cromatográficas, principalmente HPLC (Blake, 2007b, a).

Em eletroforese capilar, muitos trabalhos com desenvolvimento analítico multielementar para determinação de vitaminas foram desenvolvidos para análise de medicamentos (Su *et al.*, 2001; Aurora-Prado *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2008). Poucos artigos de revisão em CE citam a análise de vitaminas em alimentos, devido à deficiência de métodos validados e aplicados em matrizes alimentícias comparados a outras aplicações. O desafio encontrado é a sensibilidade em detectar baixos teores de vitaminas nas diferentes matrizes de alimentos. Diferentes estratégias para aumentar a detecção de baixos níveis de vitaminas são aplicados para a determinação de vitaminas em alimentos.

A determinação de riboflavina (vitamina B2) em bebidas e chá verde foi demonstrada por CZE com detecção LIF (Hu *et al.*, 2007). Este trabalho implementou um sistema de detecção onde uma fibra ótica foi introduzida dentro do capilar para a detecção por fluorescência induzida a laser, com excitação a 474 nm. Este esquema foi utilizado para limitar o efeito de espalhamento devido a superfície do capilar, assim como diminuir a reflexão da luz e reduzir o ruído de fundo. O limite de detecção atingido foi de 3,0 nmol L^{-1} sendo demonstrada a quantificação de vitamina B2 em bebidas com parâmetros comparáveis ao método fluorimétrico padrão proposto pela AOAC.

Um sistema de eletrocromatografia capilar pressurizado foi desenvolvido para a separação de 12 vitaminas hidrossolúveis em coluna monolítica de sílica-ODS (Jia *et al.*, 2007). Para aumentar a detecção do método, a pré-concentração online por

stacking amplificado por campo elétrico foi adotado. Uma injeção eletrocinética com pressão também foi utilizada e promoveu o aumento de sinal das vitaminas positivamente carregadas. Estas estratégias promoveram um aumento da sensibilidade em 3 a 35 vezes em relação à técnica convencional de injeção de amostra, com limites de detecção de 0,06 a 1,4 µg mL^{-1}. O método foi aplicado para avaliar o teor de vitaminas em amostras de milho, sendo demonstrada a quantificação das vitaminas B2, B6, B12 e ácido fólico.

Du *et al.* (2007) efetuaram um estudo comparativo de métodos de pré-concentração *online* por CZE para análise de vitaminas hidrossolúveis. Dois métodos de concentração online denominados *stacking* amplificado por campo elétrico e junção dinâmica de pH foram estudados para aumentar a sensibilidade de detecção do método. A separação e focalização de nove vitaminas foram obtidas com o método de *stacking* amplificado por campo elétrico, enquanto que, somente as vitaminas de ácido nicotínico e ácido fólico foram focalizadas e separadas por junção dinâmica de pH. Assim, o *stacking* amplificado por campo foi aplicado para a determinação de vitaminas em amostras de milho, sendo demonstrada apenas a quantificação da piridoxina e ácido nicotínico (Du *et al.*, 2007).

1.2.3 Contaminantes de alimentos

A segurança alimentar é um tópico muito importante para garantir a distribuição de alimentos saudáveis para toda a população. As doenças provocadas pelo consumo de alimentos inadequados podem ser de origem biológica, química ou física. Os perigos biológicos estão associados, na sua grande maioria, por microrganismos patogênicos responsáveis por toxi-infecções alimentares. Os riscos físicos se caracterizam pela presença de corpos estranhos como pedaços de metal,

plástico, vidro, etc. adquiridos durante o processamento do alimento. Dentro da classe dos perigos químicos, existe uma gama de compostos que podem ser cancerígenos, teratogênicos, tóxicos ou irritantes. Estes contaminantes podem ser agrotóxicos, rodenticidas, hormônios sintéticos, antibióticos, detergentes, metais pesados, entre outros.

A contaminação de alimentos, mesmo que acidental ou intencional, tem sido um tema recorrente nos últimos tempos. Nos dias de hoje devido à globalização e o mercado internacional, medidas de precaução devem ser tomadas, pois o risco da rápida disseminação de contaminantes na cadeia alimentar é grande. Um dos casos mais graves ocorreu recentemente na China onde 294.000 crianças foram afetadas e 6 morreram por ingerir formulações infantis com melamina. A melamina é uma substância química tóxica utilizada na fabricação de plástico, fertilizante e concreto. Devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio, foi ilegalmente adicionada aos alimentos para fraudar o conteúdo protéico, que geralmente é baseado em testes de teor de nitrogênio. Por permitir misturar o leite com água, empresas usaram a melamina para aumentar seu lucro (Vallejo-Cordoba *et al.*, 2005). Os corantes Sudan I-IV também são contaminantes adicionados intencionalmente aos alimentos. Estes compostos apresentam riscos à saúde por serem cancerígenos e foram utilizados em alimentos devido ao seu baixo custo e por serem amplamente utilizados na indústria química para colorir materiais como gasolina, diesel e plásticos. Este contaminante foi relacionado principalmente com condimentos de *chilli* e produtos relacionados (Rebane *et al.*, 2010).

Diversas leis, políticas, normas e padrões têm sido elaborados mundialmente para a garantia da saúde pública. Limites máximos de resíduos universais têm sido estabelecidos pela organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação -

FAO (*Food and Agricultural Organization*) e Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO – *World Health Organization*). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa é responsável pela fiscalização do monitoramento da segurança alimentar. Estes limites são baseados no conhecimento toxicológico abrangente de certo contaminante e as doses máximas são designadas para garantir a segurança humana e ambiental. As ferramentas da química analítica moderna possibilitam o monitoramento da segurança alimentar, atuando na detecção e identificação de uma diversidade de contaminantes químicos presentes em diferentes matrizes alimentícias. Estas normas necessitam de métodos analíticos com alta seletividade, especificidade e sensibilidade, capazes de realizar o monitoramento de contaminantes em diferentes alimentos, atingindo níveis dos limites máximos de resíduos requeridos.

Várias estratégias para a análise de contaminantes orgânicos como pesticidas, antibióticos, aminas biogênicas, acrilamidas, melamina e toxinas por métodos baseados na eletromigração em capilar foram revisados (Ravelo-Perez *et al.*, 2009; Vallejo-Cordoba e Gonzalez-Cordova, 2010). Algumas aplicações são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Alguns exemplos de aplicações de métodos para determinação de contaminantes por CE.

Tipo de contaminante	Compostos analisados	Amostras e seu preparo	Modo de CE e detecção	Composição do eletrólito	Referências
Pesticidas e produtos veterinários	amidosulfuron, cyprodinil, cyromazine, amazaquin, pirimicarb, demethyl perimicarb, procymidone ciprofloxacin, enrofloxacin, sulfacetamida, sulfabenzamida, sulfaclorpiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e sulfisoxazol	Leite - SPE	CZE – MS/MS	80 mmol L^{-1} acetato de amômio, pH 4,6	(Blasco *et al.*, 2009)
Antibióticos	Sulfonamidas, β-lactamas e quinolonas	Peixe – SPE	CZE – MS/MS	60 mmol L^{-1} acetato de amônio, pH 8 e 10 % metanol v/v	(Juan-García *et al.*, 2007)
Toxinas	Zearalenona	Milho – Coluna de imunoafinidade	CZE - LIF	20 mmol L^{-1} borato, pH 8,5, 1 mmol L^{-1} deoxicolato de sódio e 2 mmol L^{-1} heptakis (2,6-di-*O*-metil)-β-CD	(Maragos e Appell, 2007)
Adulterante	Melamina	Leite, iogurte, leite em pó e peixe - SLE	CZE – DAD (206 nm)	30 mmol L^{-1} Na_2HPO_4, pH 3,2	(Yan *et al.*, 2009)
Produtos de degradação	Acrilamida	Batata frita, biscoitso e cereal matinal - SPE	CZE – DAD (210 nm)	40 mmol L^{-1} fosfato de sódio, pH 8,0	(Bermudo *et al.*, 2006)
	Aminas biogênicas (histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina)	Peixe e produtos derivados - SLE	CZE - LIF	10 mmol L^{-1} Brij, 75 mmol L^{-1} borato, pH 9,7	(Baskan *et al.*, 2010)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUNÇÃO, N. A., BECHARA, E. J. H., SIMIONATO, A. V. C., TAVARES, M. F. M. (2008). Eletroforese capilar acoplada à Espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. ***Quim Nova*** 31, 2124-U2230.

AURORA-PRADO, M. S., SILVA, C. A., TAVARES, M. E., ALTRIA, K. D. (2004). Determination of folic acid in tablets by microemulsion electrokinetic chromatography. ***J Chromatogr A*** 1051, 291-296.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis: Techniques in Analytical Chemistry**. New York: A Wiley-Interscience Publication. 1995

BASKAN, S., TEZCAN, F., KOSE, S., OZTEKIN, N., ERIM, F. B. (2010). Non-ionic micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence: A new method tested with biogenic amines in brined and dry-salted fish. ***Electrophoresis*** 31, 2174-2179.

BERMUDO, E., NUNEZ, O., PUIGNOU, L., GALCERAN, M. T. (2006). Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis. ***J Chromatogr A*** 1120, 199-204.

BLAKE, C. J. (2007a). Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: A review. ***Anal Bioanal Chem*** 389, 63-76.

BLAKE, C. J. (2007b). Status of methodology for the determination of fat-soluble vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes. ***J AOAC Int*** 90, 897-910.

BLASCO, C., ANDREU, V., PICO, Y. (2009). Analytical method for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in milk by CE-MS. ***Electrophoresis*** 30, 1698-1707.

BOYCE, M. C. (2007). Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC. ***Electrophoresis*** 28, 4046-4062.

CEPEA-USP/CNA, 2011. PIB do Agronegócio - Dados de 1994 a 2010.

CIFUENTES, A. (2006). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. ***Electrophoresis*** 27, 283-303.

CROZIER, A., JAGANATH, I. B., CLIFFORD, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. ***Natural Product Reports*** 26, 1001-1043.

DU, Y. Y., JIA, L., LIU, H. Q., XING, D. (2007). Comparison of on-line concentration methods in capillary zone electrophoresis for analysis of water-soluble vitamins. ***Anal Lett*** 40, 2005-2015.

EHALA, S., VAHER, M., KALJURAND, M. (2005). Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. ***J Agr Food Chem*** 53, 6484-6490.

GARCIA-CANAS, V., CIFUENTES, A. (2007). Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electrornigration techniques. ***Electrophoresis*** 28, 4013-4030.

HERRERO, M., GARCIA-CANAS, V., SIMO, C., CIFUENTES, A. (2010). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. ***Electrophoresis*** 31, 205-228.

HERRERO, M., IBANEZ, E., CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. ***J Sep Sci*** 28, 883-897.

HU, L., YANG, X., WANG, C., YUAN, H., XIAO, D. (2007). Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection. ***J Chromatogr B*** 856, 245-251.

HUANG, H. Y., LIEN, W. C. (2005). Analyses of phenolic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. ***Electrophoresis*** 26, 3134-3140.

HURTADO-FERNANDEZ, E., GOMEZ-ROMERO, M., CARRASCO-PANCORBO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. ***J Pharmaceut Biomed*** 53, 1130-1160.

JAC, P., POLASEK, M., POSPISILOVA, M. (2006). Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. ***J Pharmaceut Biomed*** 40, 805-814.

JIA, L., LIU, Y., DU, Y., XING, D. (2007). Pressurized capillary electrochromatographic analysis of water-soluble vitamins by combining with on-line concentration technique. ***J Chromatogr A*** 1154, 416-422.

JUAN-GARCÍA, A., FONT, G., PICÓ, Y. (2007). Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS. ***Electrophoresis*** 28, 4180-4191.

KRIVANKOVA, L., PANTUCKOVA, P., GEBAUER, P., BOCEK, P. (2009). Electrolyte systems for on-line CE-MS: Detection requirements and separation possibilities. ***Electrophoresis*** 30, 203-214.

LEE, I. S. L., BOYCE, M. C., BREADMORE, M. C. (2011). A rapid quantitative determination of phenolic acids in Brassica oleracea by capillary zone electrophoresis. ***Food Chem*** 127, 797-801.

MARAGOS, C. M., APPELL, M. (2007). Capillary electrophoresis of the mycotoxin zearalenone using cyclodextrin-enhanced fluorescence. ***J Chromatogr A*** 1143, 252-257.

MUIJSELAAR, P. G., OTSUKA, K., TERABE, S. (1998). On-line coupling of partial-filling micellar electrokinetic chromatography with mass spectrometry. ***J Chromatogr A*** 802, 3-15.

NICOLAOU, I. N., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. P. (2010). Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis - Determination of the most effective wine sample pre-treatment method. ***Electrophoresis*** 31, 3895-3902.

OZAKI, H., ITOU, N., TERABE, S., TAKADA, Y., SAKAIRI, M., KOIZUMI, H. (1995). Micellar electrokinetic chromatography--mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant on-line coupling with an electrospray ionization interface. ***J Chromatogr A*** 716, 69-79.

PANTUCKOVA, P., GEBAUER, P., BOCEK, P., KRIVANKOVA, L. (2009). Electrolyte systems for on-line CE-MS: Detection requirements and separation possibilities. ***Electrophoresis*** 30, 203-214.

PANTUCKOVA, P., GEBAUER, P., BOCEK, P., KRIVANKOVA, L. (2011). Recent advances in CE-MS: Synergy of wet chemistry and instrumentation innovations. ***Electrophoresis*** 32, 43-51.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole. 2003

PINERO, M. Y., BAUZA, R., ARCE, L. (2011). Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. ***Electrophoresis*** 32, 1379-1393.

RAVELO-PEREZ, L. M., ASENSIO-RAMOS, M., HERNANDEZ-BORGES, J., RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. (2009). Recent food safety and food quality applications of CE-MS. ***Electrophoresis*** 30, 1624-1646.

REBANE, R., LEITO, I., YURCHENKO, S., HERODES, K. (2010). A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes. ***J Chromatogr A*** 1217, 2747-2757.

ROBBINS, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. ***J Agr Food Chem*** 51, 2866-2887.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., PERES, R. G., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M. (2011). Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography. ***Food Chem*** 127, 651-655.

SAWALHA, S., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2009). Characterization of phenolic compounds in diatomaceous earth used in the filtration process of olive oil by HPLC-ESI-TOF (MS). ***Agro Food Ind Hi Tec*** 20, 46-50.

SHAHIDI, F., NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press. 2004. 558 p.

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

SIMO, C., BARBAS, C., CIFUENTES, A. (2005). Capillary electrophoresis-mass spectrometry in food analysis. ***Electrophoresis*** 26, 1306-1318.

SIMO, C., GARCIA-CANAS, V., CIFUENTES, A. (2010). Chiral CE-MS. ***Electrophoresis*** 31, 1442-1456.

SU, S. C., CHOU, S. S., HWANG, D. F., CHANG, P. C., LIU, C. H. (2001). Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography for Determining Water-Soluble Vitamins in Commercial Capsules and Tablets. ***J Food Sci*** 66, 10-14.

TAVARES, M. F. M. (1996a). Capillary electrophoresis: Basic concepts. ***Quim Nova*** 19, 173-181.

TAVARES, M. F. M. (1996b). Eletroforese capilar: Conceitos básicos. ***Quim Nova*** 19, 173-181.

VALLEJO-CORDOBA, B., GONZALEZ-CORDOVA, A. F. (2010). Capillary electrophoresis for the analysis of contaminants in emerging food safety issues and food traceability. ***Electrophoresis*** 31, 2154-2164.

VALLEJO-CORDOBA, B., GONZALEZ-CORDOVA, A. F., MAZORRA-MANZANO, M. A., RODRIGUEZ-RAMIREZ, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. ***J Sep Sci*** 28, 826-836.

YAN, N., ZHOU, L., ZHU, Z. F., CHEN, X. G. (2009). Determination of Melamine in Dairy Products, Fish Feed, and Fish by Capillary Zone Electrophoresis with Diode Array Detection. ***J Agr Food Chem*** 57, 807-811.

YIN, C., CAO, Y., DING, S., WANG, Y. (2008). Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. ***J Chromatogr A*** 1193, 172-177.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM FRUTAS NATIVAS POR ELETROFORESE CAPILAR

RESUMO

Neste trabalho a separação de nove ácidos fenólicos (clorogênico, siríngico, protocatecuico, benzoico, ferúlico, vanílico, cafeico, gálico e *p*-cumárico) foi obtida por eletroforese capilar de zona. A composição do eletrólito foi otimizada por desenho fatorial 3^2 variando a concentração de tampão tetraborato de sódio 10-50 mmol L^{-1} e a porcentagem em volume de metanol de 5 a 20%. Um eletrólito composto de 50 mmol L^{-1} de tetraborato e 7,5% metanol (v/v) permitiu a separação em linha de base dos nove ácidos fenólicos em menos de 15 minutos. O método de extração líquido-líquido foi utilizado e promoveu um "clean-up" e pré-concentração da amostra, sendo avaliados os teores de ácidos fenólicos livres e hidrolisados. O método proposto foi validado obtendo-se limites de quantificação de 2,70-7,65 µg mL^{-1} e limites de detecção de 0,89-2,52 µg mL^{-1}. A linearidade foi de 10 a 100 µg mL^{-1} com R^2>0,999. Os resultados de precisão intradia apresentaram valores de coeficiente de variação de até 2,8% para tempo de migração e de 5,4% para área de pico. Para a precisão interdia, os resultados foram de até 4,8% C.V. para tempo de migração e de 4,8-11% C.V. para área de pico. Recuperações de 81 a 115% dos padrões de ácidos fenólicos nos extratos de frutas foram obtidos. O método otimizado foi aplicado para análise de frutas nativas da América do Sul como a abiu-roxo (*Chrysophyllum caimito*), amora silvestre (*Morus nigra* L.) e tomate de árvore (*Cyphomandra betacea*), identificando os ácidos fenólicos na fração livre e hidrolisada.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e amplamente distribuídos nas diversas espécies de plantas. Os ácidos fenólicos que ocorrem naturalmente em plantas abrangem duas classes de compostos, as estruturas hidroxicinâmico e hidroxibenzoico (Fig. 1). Os ácidos fenólicos encontrados na maioria das plantas são os ácidos cafeico, p-cumárico, vanílico, ferúlico e protocatecuico. Outros ácidos são encontrados em outras fontes de alimentos e plantas (ex. ácidos genístico, siríngico, etc.) (Robbins, 2003). Dentre os ácidos cinâmicos, o ácido clorogênico também é considerado em relação à sua ocorrência natural, o qual é uma molécula de ácido cafeico esterificado com o ácido quínico (Fig. 1) (Stalikas, 2007).

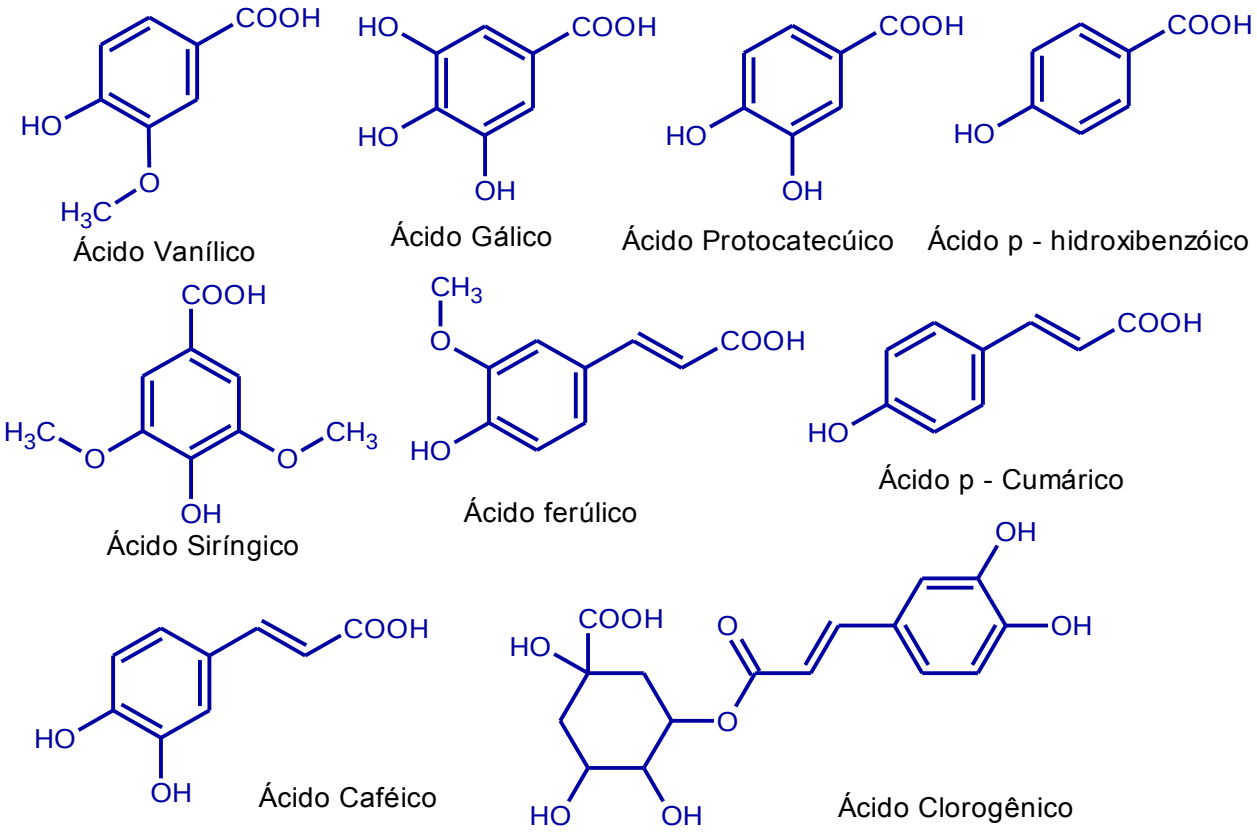


Figura 1. Estrutura dos ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são encontrados em diversas fontes de origem natural como frutas, vegetais e grãos e são fisicamente dispersos através da planta nas folhas, sementes, raízes e troncos. Os ácidos fenólicos na forma livre representam a menor fração, enquanto que a maior fração encontra-se ligada à celulose, proteínas, ligninas, flavonóides, glucose, terpenos, etc. (Stalikas, 2007).

As frutas são consideradas as principais fontes de ácidos fenólicos na dieta. Os compostos fenólicos encontrados em frutas são considerados compostos bioativos por promoverem benefícios à saúde (Szajdek e Borowska, 2008). A propriedade antioxidante de frutas foi associada com a inibição de doenças causadas por danos oxidativos, como doenças cardiovasculares, circulatórias, inflamatórias e câncer (Ness e Powles, 1997; Lea *et al.*, 2008; Szajdek e Borowska, 2008).

Apesar dos ácidos fenólicos representarem cerca de um terço dos compostos fenólicos, trabalhos demonstram interesse no comportamento antioxidante e benefícios à saúde associados aos ácidos fenólicos (Laranjinha *et al.*, 1994; Lodovici *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2005). Extratos de frutas ricas em compostos fenólicos demonstraram atividade antioxidante, maior do que alguns compostos fenólicos puros ou vitaminas, o que indica o efeito sinérgico dos antioxidantes (Vinson *et al.*, 2001).

A determinação dos ácidos fenólicos em frutas e extratos de plantas tem sido amplamente realizada por HPLC de fase reversa com detecção UV-DAD (Mattila e Kumpulainen, 2002; Luthria *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2008; Simirgiotis *et al.*, 2008). Esta técnica acoplada ao espectrômetro de massas (MS) tem sido uma importante ferramenta para a caracterização destes compostos. As interfaces com ionização por eletrospray dominam a análise dos fenólicos em frutas e produtos naturais por

LC-MS (Bystrom *et al.*, 2008; Rieger *et al.*, 2008; Rupasinghe e Kean, 2008). A análise de frutas por cromatografia gasosa também tem sido bastante utilizada para a determinação dos ácidos fenólicos. Os detectores utilizados com esta técnica tem sido o FID e MS (Zadernowski *et al.*, 2005; Saraji e Mousavinia, 2006; Proestos *et al.*, 2008; Zadernowski *et al.*, 2009). Esta técnica apresenta alta sensibilidade e seletividade, no entanto, devido à baixa volatilidade dos compostos fenólicos, o preparo de amostra é mais rigoroso, sendo necessária a sua derivação.

A eletroforese capilar tem sido uma técnica cada vez mais utilizada para o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de compostos fenólicos em matrizes complexas (Garcia-Canas e Cifuentes, 2008). Esta técnica permite a separação e identificação de compostos altamente polares que não podem ser facilmente separados por métodos tradicionais de HPLC, promovendo informações complementares e permitindo a análise simultânea de diferentes tipos de analitos em uma única corrida (Herrero *et al.*, 2005).

Diferentes modos da eletroforese capilar foram realizados para a determinação de ácidos fenólicos em plantas, frutas e alimentos. A eletroforese capilar de zona (CZE) permite a separação de compostos fenólicos ionizáveis em meio alcalino, utilizando diferentes tampões, solventes e aditivos. Vários métodos por CZE com detectores de UV ou DAD foram desenvolvidos para análise de ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos em frutas (Ehala *et al.*, 2005; Berli *et al.*, 2008), vegetais (Helmja *et al.*, 2007; Kvasnicka *et al.*, 2008), óleo de oliva (Buiarelli *et al.*, 2004; Pancorbo *et al.*, 2004) e extratos de plantas (Peng *et al.*, 2005; Sterbova *et al.*, 2006). Algumas estratégias como a utilização de modificadores do fluxo eletrosmótico (Chen *et al.*, 2001; Hernandez-Borges *et al.*, 2005; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007) e a pré-concentração *online* foram desenvolvidos para a determinação

de ácidos fenólicos (Safra *et al.*, 2006). A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) também tem sido utilizada para a determinação de ácidos fenólicos e flavonóides em extratos de plantas (Pomponio *et al.*, 2002) e alimentos (Huang *et al.*, 2005; Risso *et al.*, 2007). A eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas é uma ferramenta que contribuiu para a identificação dos compostos fenólicos em amostras de alimentos. Métodos por CE-MS foram desenvolvidos para a caracterização da fração fenólica em azeite de oliva (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2006) e nozes (Gomez-Caravaca *et al.*, 2008), utilizando-se interfaces por electrospray.

Considerando a grande complexidade de extratos de frutas e a diversidade pela qual os ácidos fenólicos podem ser encontrados na matriz de fruta, diferentes métodos para determinação quantitativa e qualitativa são de grande demanda. Neste trabalho, um método para determinação de ácidos fenólicos livres e hidrolisados por CZE em frutas nativas é proposto. O conteúdo de ácidos fenólicos (ácidos gálico, vanílico, siríngico, protocatecuico, ferúlico, cafeico, p-cumárico e clorogênico) foi investigado nas frutas abiu-roxo (*Chrysophyllum caimito*), amora silvestre (*Morus nigra* L.) e tomate de árvore (*Cyphomandra betacea*), que fazem parte da rica biodiversidade brasileira e ainda não são totalmente caracterizadas em relação ao teor de ácidos fenólicos.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água deionizada purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). O padrão de ácido clorogênico foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.); ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico e ácido *p*-cumárico foram obtidos da Fluka (Neu-Ulhm, Alemanha); o ácido siríngico da Avocado Research Chemicals Ltda (Heisham, Lancs., UK); e ácido gálico e cafeico foram adquiridos da Espectrum (Gardena, CA, USA). Os padrões foram dissolvidos em etanol na concentração de 1000 µg L^{-1} e armazenados sob refrigeração, perfazendo as soluções estoque.

Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente antes do uso, utilizando-se solução estoque de 100 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, adquirido da Merck (Darmstadt – Alemanha). O solvente metanol foi de grau cromatográfico, obtido da Tedia (Fairfield – USA). Foram utilizadas diferentes concentrações de tetraborato de sódio (TBS), cujas concentrações estão especificadas em cada eletroferograma. A composição ótima do eletrólito foi composta de 50 mmol L^{-1} de TBS, pH 9,2 e 7,5% (v/v) metanol e foi utilizada para análise das amostras.

2.2 Instrumentação

Todos os experimentos foram conduzidos em sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, U.S.A., equipado com detetor de arranjo de diodos (DAD), com detecção direta fixada a 200 nm, controle de temperatura por líquido refrigerante e programa de aquisição e tratamento de dados (32 Karat™). As injeções das amostras foram realizadas hidrodinamicamente

e as condições são especificadas em cada eletroferograma. O sistema eletroforético foi operado com polaridade normal e condições de tensão especificadas nos eletroferogramas.

Os capilares utilizados nos experimentos foram constituídos de sílica fundida, revestidos externamente com poli-imida, com 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. A temperatura do capilar foi controlada por sistema de refrigeração mantido a 25º C. O comprimento total do capilar utilizado foi de 40,2 cm e o comprimento efetivo de 30 cm. A injeção das amostras foram de 5 psi/5 s. O condicionamento inicial do capilar foi efetuado através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (20 psi/30 min) e água deionizada (20 psi/30 min). O condicionamento do capilar no início de cada dia foi feito através de lavagem com NaOH 1 mol L^{-1} (20 psi/10 min), água (20 psi/10 min) e o eletrólito de corrida (20 psi/5 min). No final do dia o capilar foi lavado com NaOH 1 mol L^{-1} (20 psi/5 min) e água (20 psi/5 min). No intervalo entre as corridas, o capilar foi recondicionado com soluções do eletrólito de corrida (20 psi/3 min).

2.3 Preparo das amostras e método de extração

As amostras de frutas de abiu-roxo (*Chrysophyllum caimito*) e tomate de árvore (*Cyphomandra betacea*), oriundas da região amazônica, foram obtidas no mercado local, enquanto que a amora silvestre (*Morus nigra* L.) foi colhida no campus universitário da USP. O método de extração dos ácidos fenólicos foi adaptado do trabalho proposto por Krygier *et al*. (Krygier *et al.*, 1982). As frutas foram cortado em pedaços, sendo mantida as cascas e retirado apenas a semente rígida do abiu-roxo. Os pedaços de frutas foram pesados e triturados em Ultra – Turrax (Ika, Alemanha), contendo cerca de 10 mL de metanol, obtendo-se o extrato

metanólico. O extrato foi submetido ao ultra-som por 5 min e depois centrifugada a 9352 g por 10 min. A seguir, o extrato foi reduzido pela evaporação do metanol adicionado através de evaporador rotatório a vácuo. A suspensão aquosa foi acidificada com HCl concentrado a pH 2,0, para liberar os ácidos fenólicos livres. Em seguida, a solução foi saturada com cloreto de sódio e os ácidos fenólicos livres foram extraídos 3 vezes com éter dietílico na proporção de 1:1. As frações da fase orgânica foram separadas da fase aquosa e combinadas para evaporação sob fluxo de nitrogênio. Os compostos fenólicos foram ressuspensos em 1 mL de etanol : água (1:1) e filtrados em membrana 0,45 µm. A esta solução foi adicionado o padrão interno de triptofano na concentração de 40 µg mL^{-1}. A fase aquosa remanescente foi hidrolisada com NaOH 4 mol L^{-1} contendo 10 mmol L^{-1} de EDTA e 1% de ácido ascórbico, por 4 horas (Nardini *et al.*, 2002). Posteriormente, os ácidos fenólicos hidrolisados foram extraídos e preparados da mesma maneira que os ácidos fenólicos livres.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Otimização

Com intuito de avaliar a qualidade de separação dos nove ácidos fenólicos em termos de resolução, forma de pico e tempo de migração total, testes preliminares com diferentes tampões (fosfato e tetraborato) e solventes (metanol e acetonitrila) foram efetuados. A combinação de tetraborato de sódio pH 9,2 e metanol produziram melhores condições de formato de pico e separação dos ácidos fenólicos estudados. Assim, para otimizar a separação em linha de base de nove ácidos fenólicos a metodologia de superfície de resposta foi utilizada. O modelo fatorial 3^2 foi aplicado, onde se considerou a concentração de tetraborato de sódio ([TBS]) e porcentagem de metanol (% MeOH) como variáveis independentes, com três níveis de variação (+1, 0 e -1). Foram gerados nove experimentos com três repetições no ponto central.

A identificação dos padrões nas diversas condições eletroforéticas testadas foi feita através da comparação dos espectros de UV-Vis (Fig. 2) e dos tempos de migração obtidos nestes eletroferogramas e aqueles obtidos em corridas individuais, para cada substância, na mesma condição. O pH dos eletrólitos foram próximos de 9,2. Nesta faixa de pH todos os ácidos fenólicos analisados encontravam-se na forma ionizada, uma vez que seus valores de pK_{a1} encontram-se na faixa de 4,2 a 4,5 e pK_{a2} de 8,3 a 9,2 (Tabela 1).

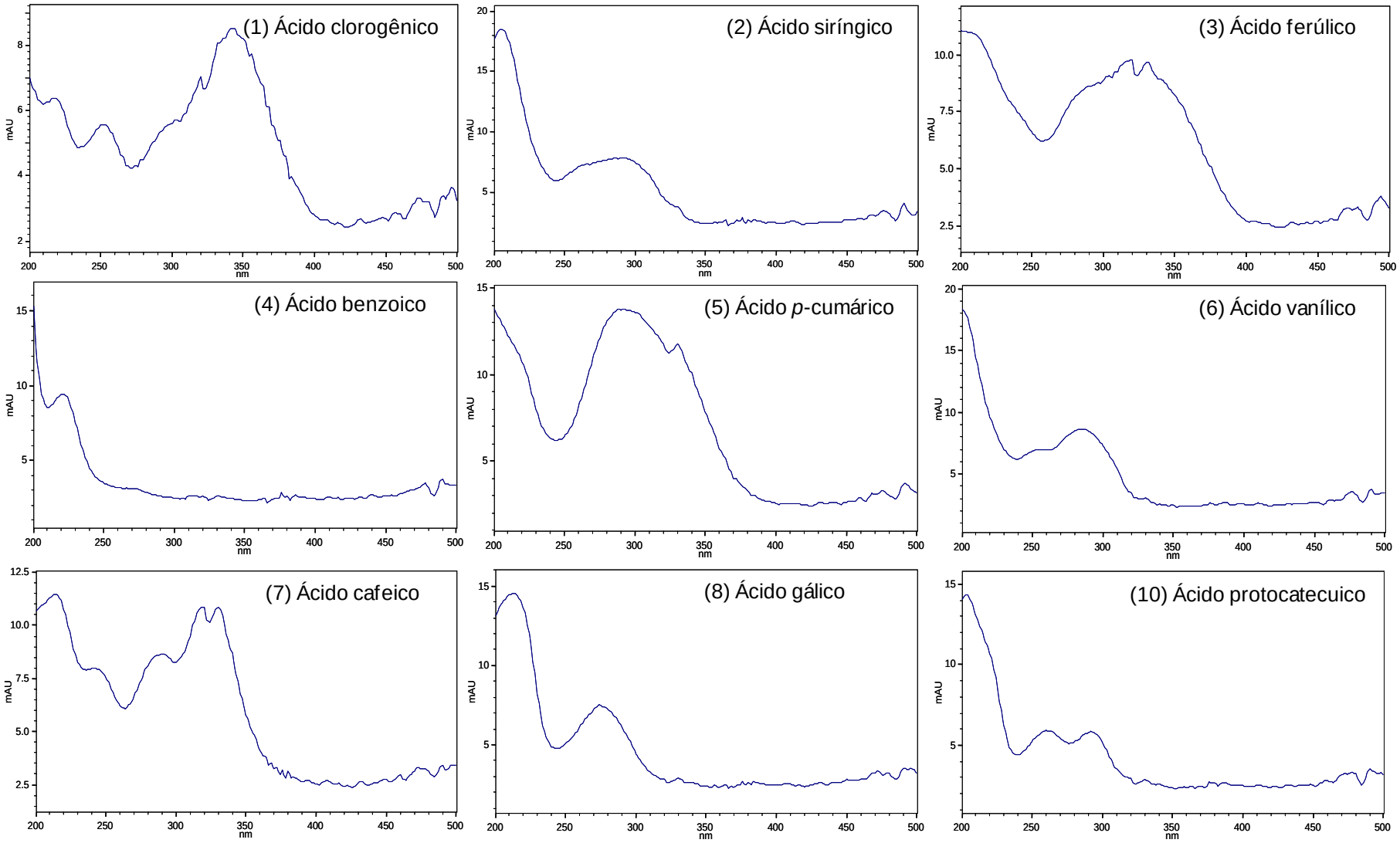


Figura 2. Espectros de absorção UV-Vis dos ácidos fenólicos.

Tabela 1. Valores de pK_a dos ácidos fenólicos (Erdemgil *et al.*, 2007).

Composto	**pK_{a1}**	**pK_{a2}**	**pK_{a3}**
Ácido gálico	4,24	8,32	9,94
Ácido protocatecuico	4,34	8,72	8,86
Ácido vanílico	4,29	8,83	-
Ácido siríngico	4,19	8,98	-
Ácido cafeico	4,45	8,26	13,16
Ácido *p*-cumárico	4,39	8,46	-
Ácido ferúlico	4,54	8,64	-
Ácido *p*-hidroxibenzoico	4,38	8,94	
Ácido clorogênico	4,17	9,20	12,19

Dois desenhos fatoriais 3^2, A (Tabela 2) e B (Tabela 3), foram aplicados avaliando diferentes níveis de concentração de TBS e porcentagem de metanol. As resoluções entre os pares dos seis primeiros picos foram utilizadas como fator resposta, uma vez que os últimos picos foram bem resolvidos nas condições estudadas. Neste caso, valores negativos de resolução representam a inversão de migração de picos. Os eletroferogramas dos dois desenhos fatoriais encontram-se nas Figuras 2 e 3. Baseado em experimentos preliminares, primeiramente o desenho fatorial A (Fig. 3) foi construído, onde a concentração de TBS variou de 10 mmol L^{-1} (-) a 30 mmol L^{-1} (+) e a %MeOH, de 10% v,v (-) a 20% v,v (+), com adição dos pontos centrais.

Observando o comportamento dos ácidos fenólicos na Figura 3, verificou-se que o aumento da %MeOH causou mudanças significativas na seletividade, incluindo a inversão da ordem de migração de alguns compostos. Uma condição razoável é obtida com o aumento da [TBS] e diminuição da %MeOH, (+),(-).

Entretanto, mesmo nesta condição, a resolução entre alguns picos não atingem valores de no mínimo 2,0, o que não é adequado para a validação do método, especialmente para aplicação em matrizes complexas como extratos de frutas (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de resolução obtidos com desenho experimental A.

Ensaios	Variávies dependentes		Variáveis independentes*				
	[TBS] (mM)	% MeOH (v/v)	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$R_{3,4}$	$R_{4,5}$	$R_{5,6}$
1	10 (-1)	10 (-1)	-0,71	0,71	2,9	0,0	0,89
2	20 (0)	10 (-1)	1,6	1,6	6,1	0,9	1,5
3	30 (+1)	10 (-1)	4,1	2,5	7,1	1,8	1,6
4	10 (-1)	15 (0)	-1,4	1,6	7,9	-2,2	0,6
5	20 (0)	15 (0)	0,0	2,3	10	-2,6	0,95
6	30 (+1)	15 (0)	2,3	2,0	14	-2,7	1,2
7	10 (-1)	20 (+1)	-1,8	1,2	5,5	-2,2	0,60
8	20 (0)	20 (+1)	-1,9	3,2	17	-5,1	0,0
9	30 (+1)	20 (+1)	0,0	4,1	16	-5,3	0,0
10	20 (0)	15 (0)	0,0	2,2	7,5	1,0	1,9
11	20 (0)	15 (0)	0,0	2,2	7,1	1,0	1,7

Tabela 3. Valores de resolução obtidos com desenho experimental B.

Ensaios	Variávies dependentes		Variáveis independentes*				
	[TBS] (mM)	% MeOH (v/v)	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$R_{3,4}$	$R_{4,5}$	$R_{5,6}$
1	30 (-)	5 (-)	4,1	1,4	3,2	3,1	1,6
2	40 (0)	5 (-)	4,9	1,6	2,8	4,7	2,3
3	50 (+)	5 (-)	8,1	2,0	3,0	7,9	2,7
4	30 (-)	7,5 (0)	2,9	1,8	5,2	2,4	1,6
5	40 (0)	7,5 (0)	4,7	1,9	5,1	3,5	2,2
6	50 (+)	7,5 (0)	7,8	2,7	6,5	5,2	2,3
7	30 (-)	10 (+)	3,3	2,2	7,3	1,4	1,7
8	40 (0)	10 (+)	4,5	2,6	8,2	2,0	1,9
9	50 (+)	10 (+)	6,4	3,1	8,0	2,5	2,0
10	40 (0)	7,5 (0)	4,4	2,0	4,8	3,8	2,0
11	40 (0)	7,5 (0)	4,83	1,96	4,98	3,59	2,30

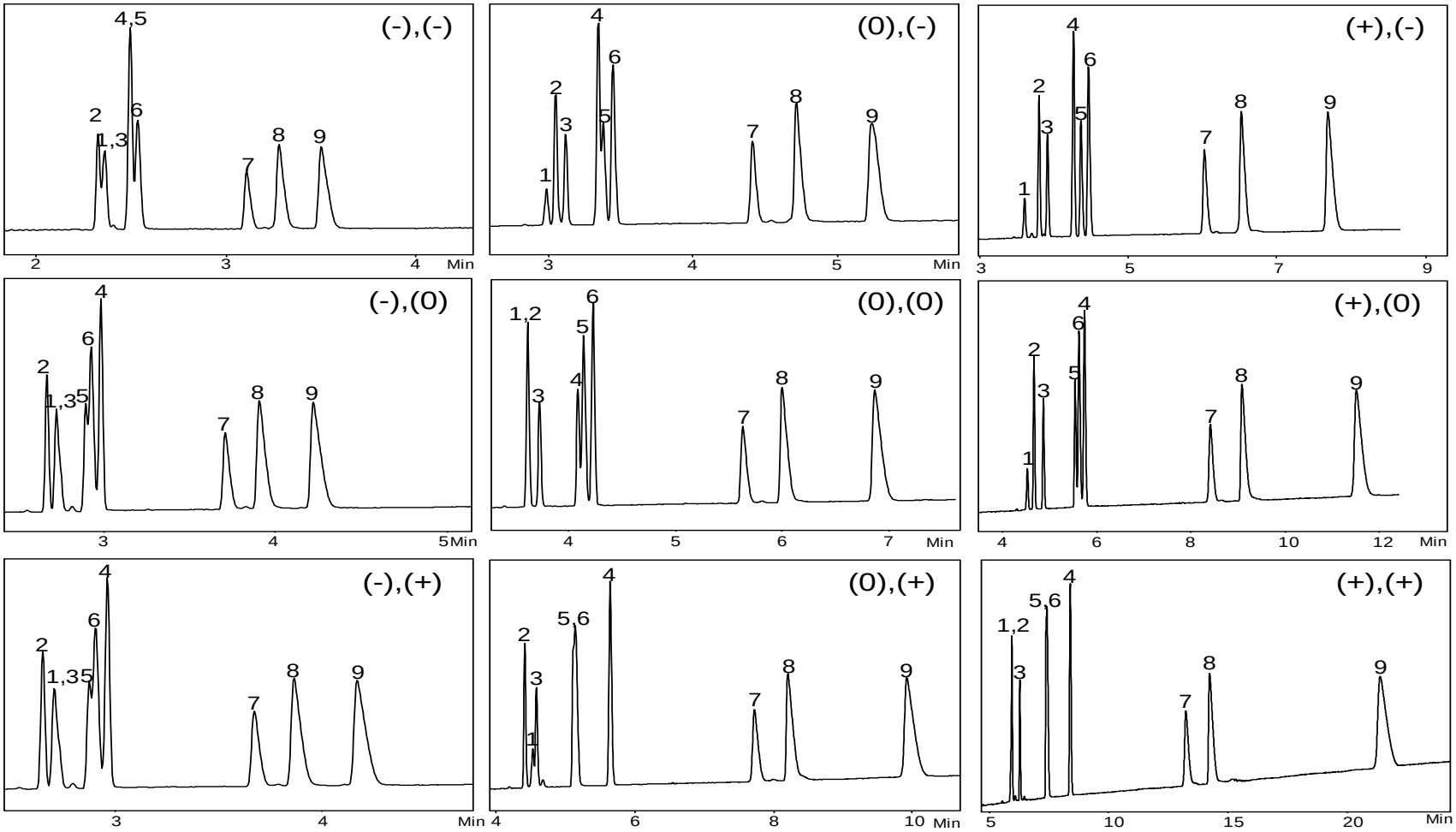


Fig 3. Eletroferogramas obtidos do desenho experimental A. Composição do eletrólito: concentrações de TBS de 10 mmol L^{-1} (-), 20 mmol L^{-1} (0) e 30 mmol L^{-1} (+) e porcentagem de metanol (v/v) de 10% (-), 15% (0) e 20% (+). Condições analíticas: injeção hidrodinâmica 5psi/5s; 25º C, tensão aplicada de +30 kV; detecção direta a 200 nm. Identificação dos picos: ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) cafeico, (8) gálico e (9) protocatecuico.

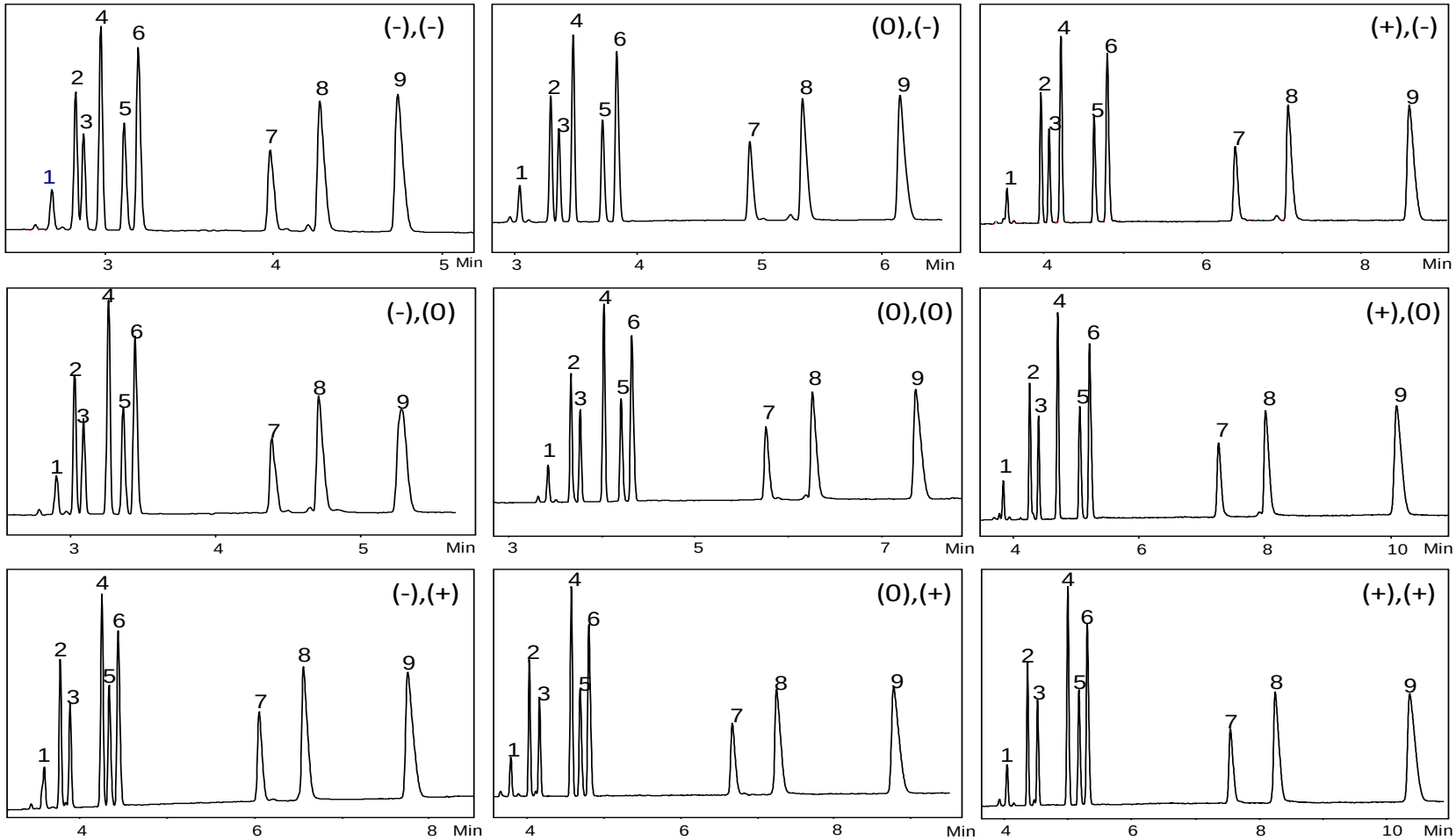


Fig 4. Eletroferogramas obtidos desenho experimental B. Composição do eletrólito: concentrações de TBS de 30 mM (-), 40 mmol L^{-1} (0), 50 mmol L^{-1} (+) e % (v/v) metanol de 5,0% (-), 7,5% (0) e 10% (+).Condições analíticas: injeção hidrodinâmica 5psi/5s; 25º C, tensão aplicada de +30 kV; detecção direta a 200 nm. Identificação dos picos: ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) cafeico, (8) gálico e (9) protocatecuico.

O tratamento dos dados obtidos no fatorial A indicam que um aumento na concentração de TBS e uma diminuição da % MeOH podem favorecer a qualidade da separação. Os dados do tratamento estatístico não são demonstrados por apresentar falta de ajuste em alguns modelos, entretanto, visualizando os eletroferogramas da Fig. 3 é possível observar que o melhor resultado de separação foi obtido no experimento 3, com alto nível de concentração de TBS e baixa porcentagem de MeOH. Entretanto, como os pares de pico 4,5 e 5,6 (Tabela 2) não apresentaram resolução acima de 2,0, satisfatória para separações, a extrapolação dos valores experimentais para níveis mais altos de TBS e menores de MeOH foi estudado. Assim, o desenho fatorial B foi implementado, onde a concentração de TBS variou de 30 mmol L^{-1} (-) a 50 mmol L^{-1} (+) e a % MeOH de 5% v,v (-) a 10% v,v (+), em adição ao ponto central. As condições estudadas, assim como, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3. Como pode ser observado na Figura 4, a resolução em linha de base de todos os picos foi obtida na maioria das condições, exceto na condição (-),(-). Como esperado, em baixas concentrações de TBS as separações são mais rápidas, devido à baixa compressão da dupla camada da superfície do capilar e aumento do fluxo eletrosmótico. O aumento da %MeOH promoveu mudanças na seletividade dos picos 1 a 6, entretanto em menor extensão em relação ao desenho fatorial A.

Os resultados demonstrados na Tabela 3 foram aplicados a um modelo quadrático para dois fatores (x_1 para [TBS] e x_2 para %MeOH) para gerar a superfície de resposta de acordo com seguinte equação:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \qquad [1]$$

Onde, $\hat{y}$ são os valores de resolução entre os pares de picos 1 a 6, x_1 é a concentração de TBS e x_2 a % de MeOH, b_0 é o intercepto, bi são os coeficientes de primeira ordem e b_{11} e b_{22} os coeficientes de segunda ordem para estimar a curvatura, com b_{12} representando a interação. Os resultados estão listados na Tabela 4, com os respectivos erros padrões de regressão. Valores de *F* parcial e *p* para os coeficientes também foram incluídos na Tabela 4, entre parêntesis, abaixo de cada coeficiente. Todos os modelos foram validados por ANOVA, não apresentando falta de ajuste em nenhum dos modelos. Coeficientes com $p<0,05$ foram desconsiderados do modelo.

A separação dos compostos foi obtida em todas as condições, no entanto, para a obtenção da melhor condição de separação, uma função de decisão multicritério foi aplicada. As superfícies de respostas foram geradas a partir dos modelos obtidos para cada função resposta e são apresentadas na Figura 5.

Tabela 4. Coeficientes da função de resolução (equação [1]) e dados estatísticos correspondentes.

$\hat{y}$	b_0	b_1 ($F_{parcial}$, p)	b_2 ($F_{parcial}$, p)	b_{11} ($F_{parcial}$, p)	b_{22}	b_{12} ($F_{parcial}$, p)	R^2 aj	F	p
$Rs_{1,2}$	-1,42 ± 0,18	0,198 ± 0,24 (68,84; 0,0001)	-0,187 ± 0,24 (3,85; 0,0855)	-	-	-	0,8761	36,34	0,0001
$Rs_{2,3}$	2,122 ± 0,038	-0,120 ± 0,035 (134,74; 0,0001)	0,197 ± 0,035 (198,75; 0,0001)	0,00201 ± 0,052 (15,08; 0,0060)	-	-	0,9719	116,2	0,0001
$Rs_{3,4}$	-3,09 ± 0,14	0,0313 ± 0,19 (2,76; 0,1355)	0,961 ± 0,19 (162,79; 0,0001)	-	-	-	0.9424	82,77	0,0001
$Rs_{4,5}$	-8,34 ± 0,089	0,422 ± 0,12 (147,82; 0,0001)	0,817 ± 0,12 (182,04; 0,0001)	-	-	-0,0367 ± 0,15 (38,51; 0,0004)	0,9734	122,8	0,0001
$Rs_{5,6}$	-0,890 ± 0,041	0,0873 ± 0,055 (34,38; 0,0006)	0,219 ± 0,055 (11,34; 0,0120)	-	-	-0,00733 ± 0,067 (7,41; 0,0297)	0,8337	17,71	0,0012

R^2 aj Coeficiente de correlação ajustado.
F valor F de Fisher
p probabilidade

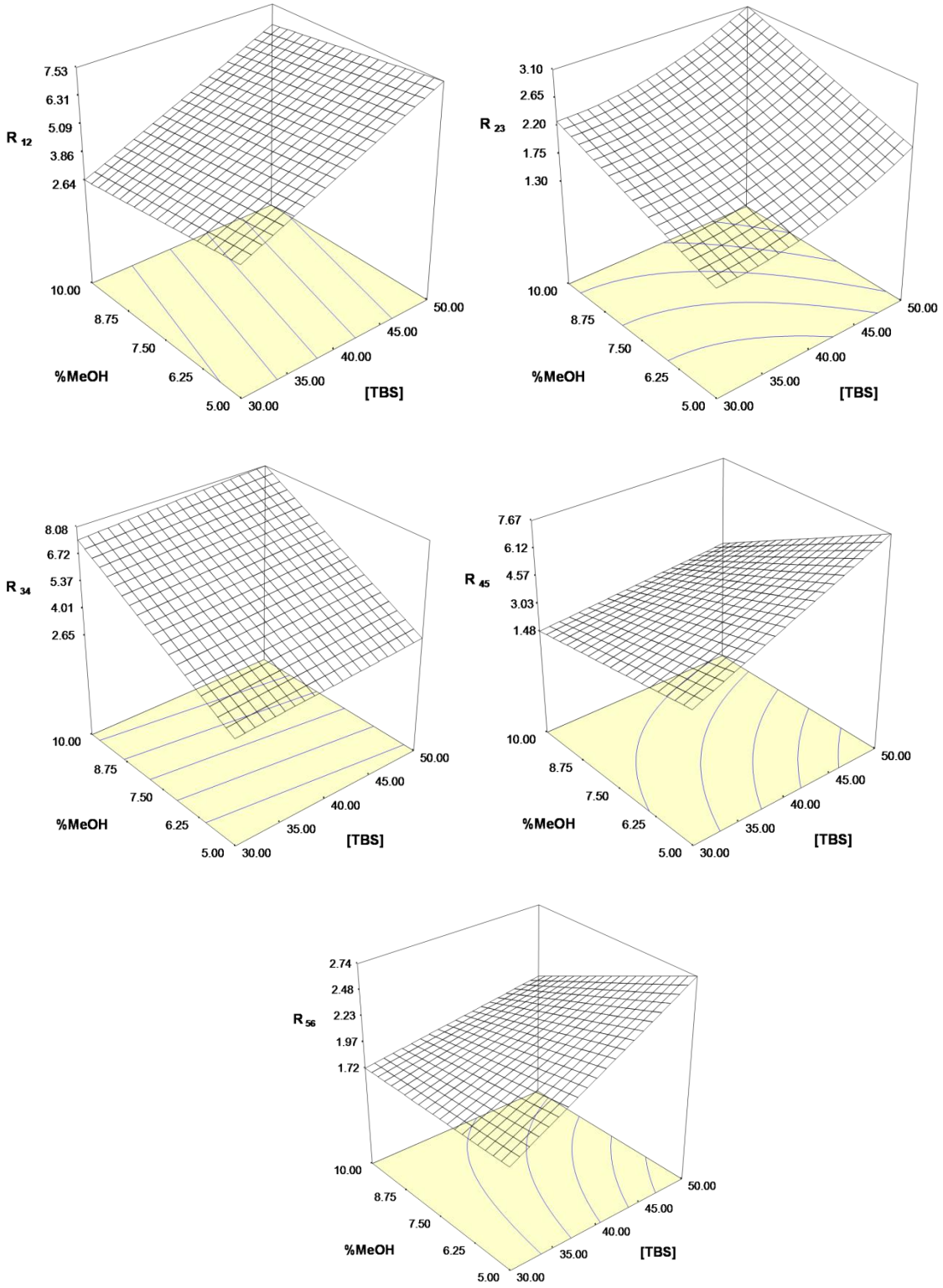


Figura 5. Superfícies de resposta das resoluções obtidas no desenho experimental B em função da concentração de TBS e % MeOH.

Para a otimização do experimento, com várias respostas, foi aplicado a metodologia de otimização simultânea, função de desejabilidade Derringer (Jimidar *et al.*, 1996). O método se baseia na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo [0,1]; 0 significa um valor inaceitável, e 1 o valor mais desejável. A natureza da função depende dos objetivos do experimento. Uma vez que as funções de desejabilidade (d) tenham sido especificadas para todas as respostas, estas são combinadas numa desejabilidade global (D), normalmente dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \ldots d_m} \qquad (8)$$

Assim, a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global. (Derringer e Suich, 1980; Jimidar *et al.*, 1996). A desejabilidade (d) de cada resposta é definida por:

—— (9)

—— (10)

(11)

Onde A é o valor alvo ótimo, situado em algum ponto dentro de uma faixa de aceitação, cujos limites inferior e superior são representados por LI e LS, respectivamente. O valor de d está restrito ao intervalo [0,1]. Uma desejabilidade igual a 1 só será obtida se a resposta coincidir exatamente com o valor alvo e tornar os numeradores das frações iguais aos respectivos denominadores. À medida que o valor de $\hat{y}$ se afasta do alvo A, o valor da desejabilidade irá caindo, tornando-se zero

quando um dos limites da faixa de aceitação for alcançado. A taxa de variação da desejabilidade com a resposta estimada pelo modelo é definida pelos valores dos expoentes s e t. Fazendo-os variar, podemos acelerá-la ou retardá-la e assim atribuir diferentes desejabilidades aos diversos níveis da resposta. Valores altos dos dois expoentes farão com que a desejabilidade caia rapidamente, tornando-se muito baixa a menos que $\hat{y}$ esteja muito perto do alvo. Valores baixos, por outro lado, permitirão que a resposta tenha uma variação mais ampla sem que a desejabilidade seja muito diminuída. A escolha vai depender da prioridade ou da importância relativa que é atribuída a cada resposta (Barros Neto, 2007).

Foram observados diferentes comportamentos para a separação dos diferentes pares. Para a obtenção de condições de concentração de TBS e porcentagem de metanol favoráveis para a separação de todos os compostos, foi construída a superfície de resposta de otimização do experimento, considerando-se a maximização de todas as respostas em relação à função desejabilidade (D). Assim, de acordo com a equação 9, os valores de A foram os valores máximos de resolução observados em cada experimento, os LIs os valores mínimos de resolução de cada experimento e o valor do expoente s foi de 1. A superfície de resposta encontra-se na Figura 6.

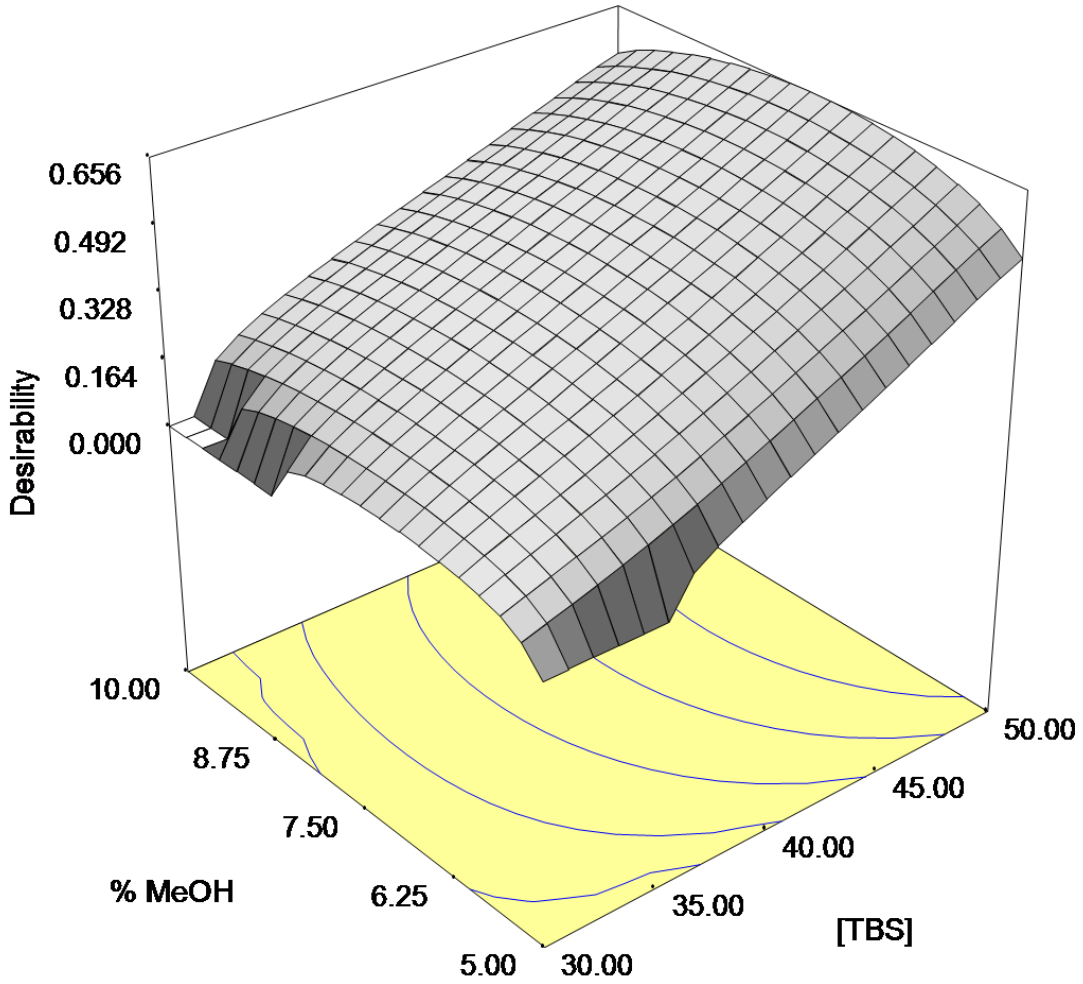


Figura 6. Superfície de resposta de otimização do experimento fatorial B em função da concentração de TBS e porcentagem de metanol.

A superfície de resposta de otimização do segundo experimento demonstrou um aumento na resposta com o aumento da concentração de TBS e utilização de faixas intermediárias da porcentagem de metanol. A ótima condição da função desejabilidade (0,656) foi atingida com as condições de 50 mmol L^{-1} de TBS e 7,46 % (v/v) de metanol. A superfície demonstra uma possível expansão para obtenção de uma região máxima em direção ao aumento da concentração de TBS. No entanto, o aumento da concentração de TBS acima de 50 mmol L^{-1} no sistema eletroforético estudado promoveu uma elevação da corrente (acima de 100 mA). Este aumento da corrente pode interferir na eficiência e repetibilidade da separação

dos analitos, devido ao efeito Joule. Assim, a melhor condição obtida através deste planejamento experimental para a separação dos compostos foi a utilização de TBS na concentração de 50 mmol L^{-1} e porcentagem de metanol de 7,5%. O eletroferograma representativo com os padrões de ácidos fenólicos na condição otimizada encontra-se na Figura 7. Este eletroferograma apresentou um pequeno aumento no tempo de retenção dos compostos em relação ao eletroferograma apresentado na Figura 4 devido a diferentes condições de condicionamento utilizadas. Esta condição foi reproduzida para a análise de frutas e considerada adequada para a aplicação em matrizes complexas.

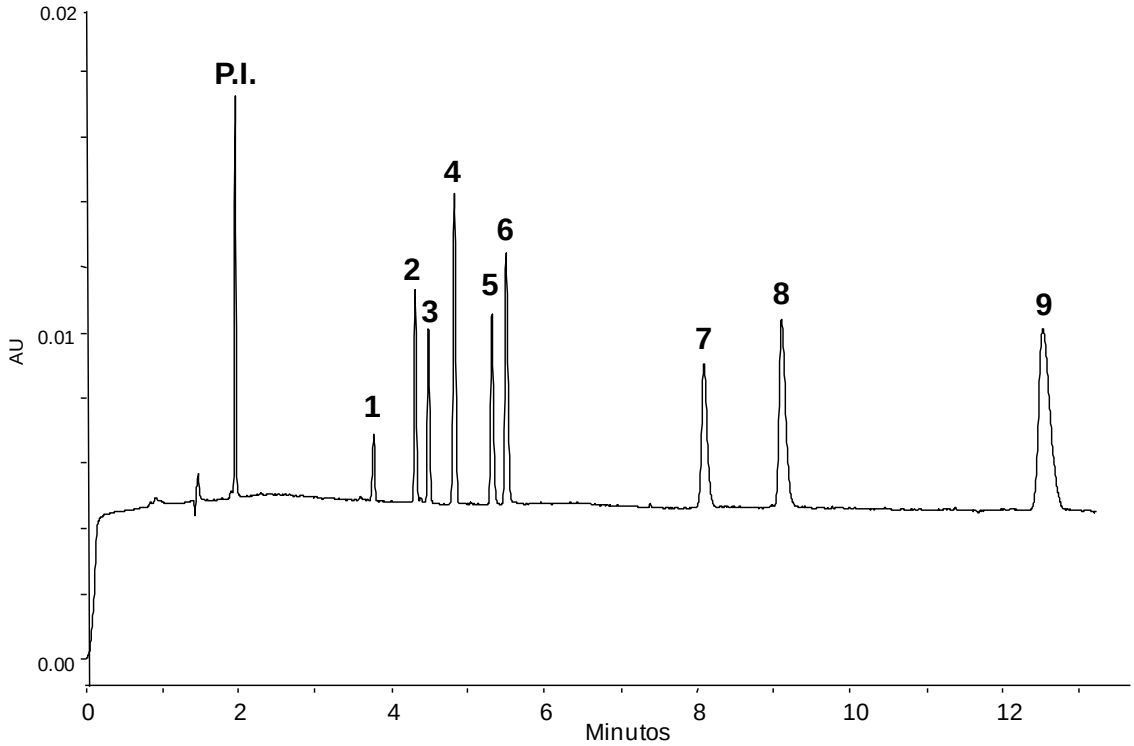


Figura 7. Eletroferograma dos padrões de ácidos fenólicos na condição otimizada: 50 mmol L^{-1} de TBS, 7,5% MeOH (v/v), pH 9,2. Outras condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 5 s; tensão aplicada de 30 kV; 25º. C; detecção a 200 nm. Identificação dos picos: ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) cafeico, (8) gálico, (9) protocatecuico e (P.I.) padrão interno de triptofano.

3.2 Validação

A seletividade do método foi estabelecida pela separação em linha de base dos ácidos fenólicos investigados (Fig 7). A precisão instrumental foi caracterizada pela triplicata de injeção das soluções padrões em três níveis de concentração avaliando-se as repetibilidades intradia e em três dias diferentes. Os resultados são demonstrados na Tabela 5. A repetibilidade do tempo de migração e área de pico foram abaixo de 2,8 e 5,4% C.V., respectivamente. A precisão entre dias para resultados de tempo de migração foram abaixo de 4,8% C.V.. Entretanto, para razões de área de pico em três níveis de concentração, a precisão variou de 4,8 a 11%; este resultado indica que a superfície do capilar foi alterada com o tempo.

Estudos de exatidão foram conduzidos pela avaliação das taxas de recuperação de soluções padrões na concentração de 20 µg mL^{-1} adicionadas aos extratos das frações livres e hidrolisadas (Tabela 6). Foram obtidos valores de recuperação entre 81 e 115%, com valores de desvio padrão menores que 6,4. Entretanto, estes resultados indicam apenas o efeito da matriz na recuperação do método e, portanto, não servem para avaliar o desempenho de extração em suas várias etapas. Uma melhor investigação do processo de recuperação na extração é apresentada no próximo capítulo.

A linearidade do método foi determinada pela qualidade dos dados estatísticos apresentadas na Tabela 7. Curvas analíticas foram construídas nas concentrações de 10 – 100 µg mL^{-1} (exceto para o ácido clorogênico que apresentou linearidade na faixa de 10 – 75 µg mL^{-1}), contendo padrão interno (40 µg mL^{-1} de triptofano). Altos valores de F, baixos valores de erros de regressão e coeficientes de determinação (R^2) de até 0,999 foram obtidos, indicando boa linearidade do método. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram baseados na

razão do desvio padrão do intercepto e sua inclinação, multiplicados 3,3 e 10, repectivamente. Os LD dos ácidos fenólicos variaram de 1,3 a 3,8 μg mL^{-1} e LQ de 4,0 a 11 μg mL^{-1}.

Tabela 5. Valores de C.V. (%) do tempo de migração e área relativa.

ACIDOS FENÓLICOS	PRECISÃO INTRADIA % CV (n=3)				PRECISÃO INTERDIA % CV (n=9)			
	Tempo de migração	Razão de área de pico			Tempo de migração	Razão de área de pico		
		10	50	100		10	50	100
			µg mL^{-1}				µg mL^{-1}	
Ácido clorogênico	0,44	0,93	4,0	3,3	1,6	4,8	6,3	4,9
Ácido siríngico	0,39	2,3	2,3	2,3	2,0	5,9	8,2	5,8
Ácido ferúlico	0,39	2,2	0,60	3,3	3,5	5,7	7,4	6,0
Ácido benzoico	0,91	2,4	2,5	2,6	3,6	11	7,5	8,5
Ácido *p*-cumárico	0,46	4,4	5,4	2,4	2,7	8,3	10	7,5
Ácido vanílico	0,46	3,6	4,5	1,1	4,4	7,5	9,2	5,9
Ácido cafeico	1,7	2,2	0,43	1,3	4,5	7,3	7,6	6,2
Ácido gálico	2,0	1,3	0,81	1,3	4,2	5,3	4,3	5,2
Ácido protocatecuico	2,8	0,47	1,7	1,9	4,8	6,6	11	11

Tabela 6. Resultados de exatidão na validação do método (testes de recuperação).

ACIDOS FENÓLICOS	ABIU – ROXO		AMORA SILVESTRE		TOMATE DE ÁRVORE	
	Fração livre	**Fração hidrolisada**	**Fração livre**	**Fração hidrolisada**	**Fração livre**	**Fração hidrolisada**
Ácido clorogênico	97,5 ± 1,0	97,2 ± 2,5	85,3 ± 6,1	84,6 ± 0,88	88,3 ± 3,5	90,2 ± 1,4
Ácido siríngico	100,2 ± 0,94	98,2 ± 1,2	99,5 ± 1,3	98,4 ± 1,2	95,8 ± 0,67	85,8 ± 3,5
Ácido ferúlico	98,9 ± 1,2	97,5 ± 2,2	98,5 ± 0,93	98,3 ± 1,5	99,7 ± 0,92	98,4 ± 2,4
Ácido benzoico	99,5 ± 0,44	98,3 ± 1,7	99,2 ± 1,9	87,2 ± 1,4	98,3 ± 1,1	84,7 ± 2,4
Ácido *p*-cumárico	99,8 ± 1,1	93,7 ± 2,2	98,7 ± 2,2	95,3 ± 2,2	97,1 ± 0,85	84,1 ± 2,5
Ácido vanílico	100,5 ± 0,88	99,2 ± 0,56	97,5 ± 2,2	87,2 ± 3,5	95,4 ± 1,2	81,3 ± 2,4
Ácido cafeico	98,9 ± 1,5	89,2 ± 5,7	92,6 ± 1,1	95,7 ± 2,0	94,5 ± 1,7	115,0 ± 3,2
Ácido gálico	102,0 ± 2,6	110,3 ± 6,4	105,3 ± 5,7	96,5 ± 2,3	94,8 ± 5,9	95,0 ± 1,3

Tabela 7. Linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método proposto.

ÁCIDO FENÓLICO	INTERCEPTO	INCLINAÇÃO	R^2	F	EP	*p*	LD* ($\mu g\ mL^{-1}$)	LQ** ($\mu g\ mL^{-1}$)
Ácido clorogênico	-0,0083 ± 0,0055	0,0110 ± 0,0001	0,9996	7036	0,008	$4x10^{-5}$	1,65	5,00
Ácido siríngico	-0,068 ± 0,027	0,0353 ± 0,0005	0,9993	5528	0,040	$2x10^{-7}$	2,52	7,65
Ácido ferúlico	0,027 ± 0,013	0,0296 ± 0,0002	0,9998	16600	0,019	$2x10^{-8}$	1,44	4,39
Ácido benzoico	0,004 ± 0,018	0,0541 ± 0,0003	0,99986	28984	0,026	$7x10^{-8}$	1,10	3,33
Ácido *p*-cumárico	-0,029 ± 0,023	0,0397 ± 0,0004	0,9996	9717	0,034	$6x10^{-8}$	1,91	5,79
Ácido vanílico	-0,072 ± 0,030	0,0606 ± 0,0005	0,9997	12711	0,045	$4x10^{-8}$	1,63	4,95
Ácido cafeico	0,025 ± 0,018	0,0551 ± 0,0003	0,99986	29253	0,027	$7x10^{-9}$	1,08	3,27
Ácido gálico	0,045 ± 0,022	0,0815 ± 0,0004	0,99991	44461	0,033	$3x10^{-9}$	0,89	2,70
Ácido protocatecuico	0,086 ± 0,10	0,136 ± 0,002	0,9993	5402	0,16	$2x10^{-7}$	2,43	7,35

EP erro padrão da regressão
*LD = 3.3x(desvio padrão do intercepto/inclinação da reta)
**LQ = 10x(desvio padrão do intercepto/inclinação da reta)

3.3 Determinação dos ácidos fenólicos em frutas nativas

O método proposto foi aplicado para a análise das frutas encontradas no Brasil como amora selvagem, tomate de árvore e abiu-roxo. Os eletroferogramas obtidos das frutas são apresentados na Figura 8 e 9. A dificuldade encontrada na análise de alimentos encontra-se na complexidade da maioria das matrizes. Entretanto, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9, o processo de extração adotado promoveu boa capacidade de separação dos ácidos fenólicos sob investigação. Os tempos de migração dos ácidos fenólicos na amostra foram relativamente diferentes em relação aos tempos de migração das soluções padrão devido ao efeito da matriz. Em CZE, os tempos de migração são sensíveis a pequenas mudanças no pH do tampão e da força iônica. Assim, a identificação dos picos foi acompanhada pela adição de alíquotas de soluções padrão aos diferentes extratos e pela comparação do espectro UV-Vis de cada pico nos eletroferogramas das amostras.

A Tabela 8 apresenta os resultados de quantificação expressos em µg por g de fruta fresca. O abiu-roxo também conhecido como caimito ou maçã estrela (*star apple*) é uma fruta tropical encontrada na América do sul. De acordo com os resultados (Tabela 8), o abiu-roxo contém os ácidos ferúlico e *p*-cumárico e quantidades relativas de ácido gálico; a amora silvestre é rica em ácido cafeico e contém quantidades equivalentes de ácido clorogênico, *p*-cumárico e protocatecuico. Do mesmo modo, o tomate de árvore que é uma fruta subtropical, também é rica em ácido cafeico e contém quantidades variadas de ácido clorogênico, siríngico, ferúlico e *p*-cumárico.

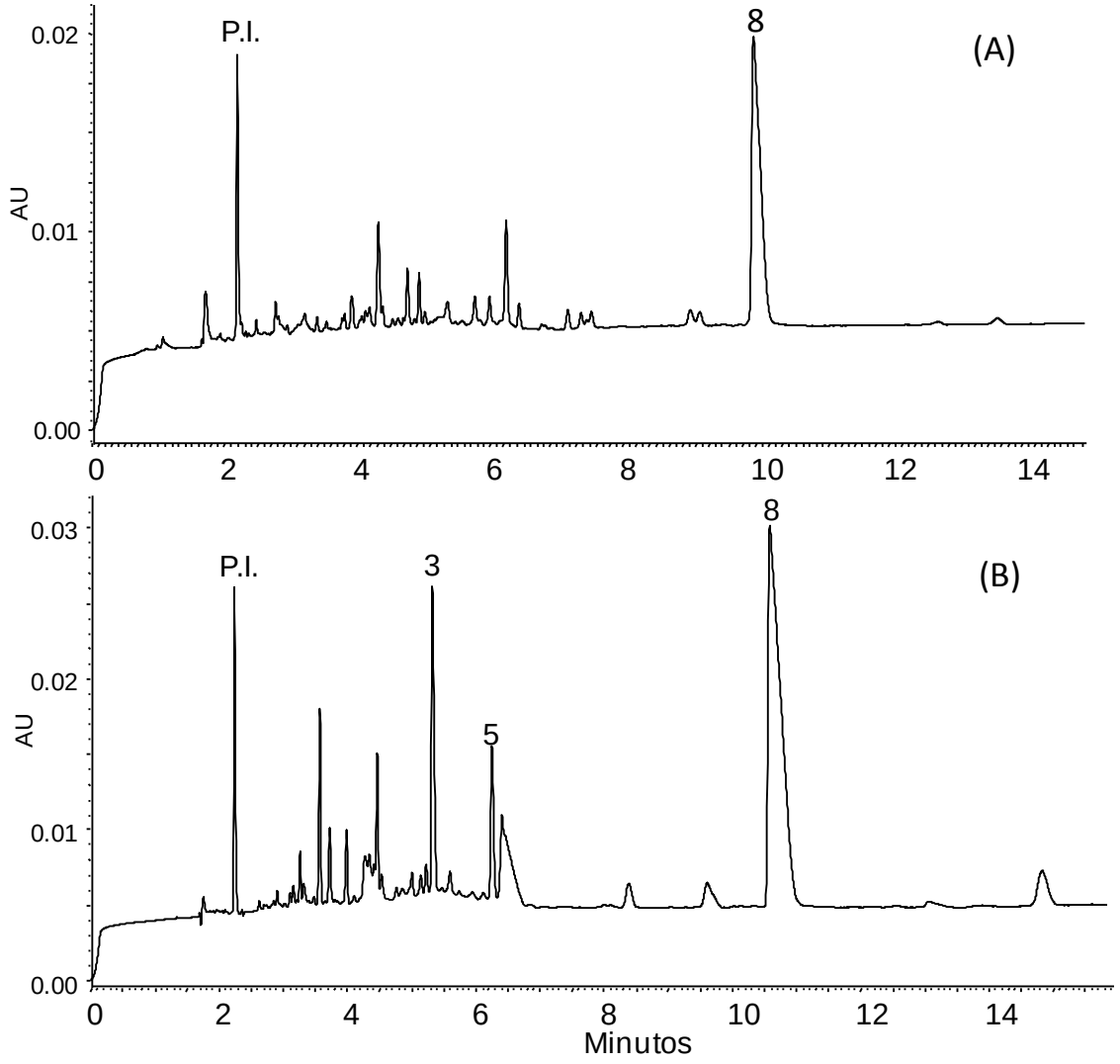
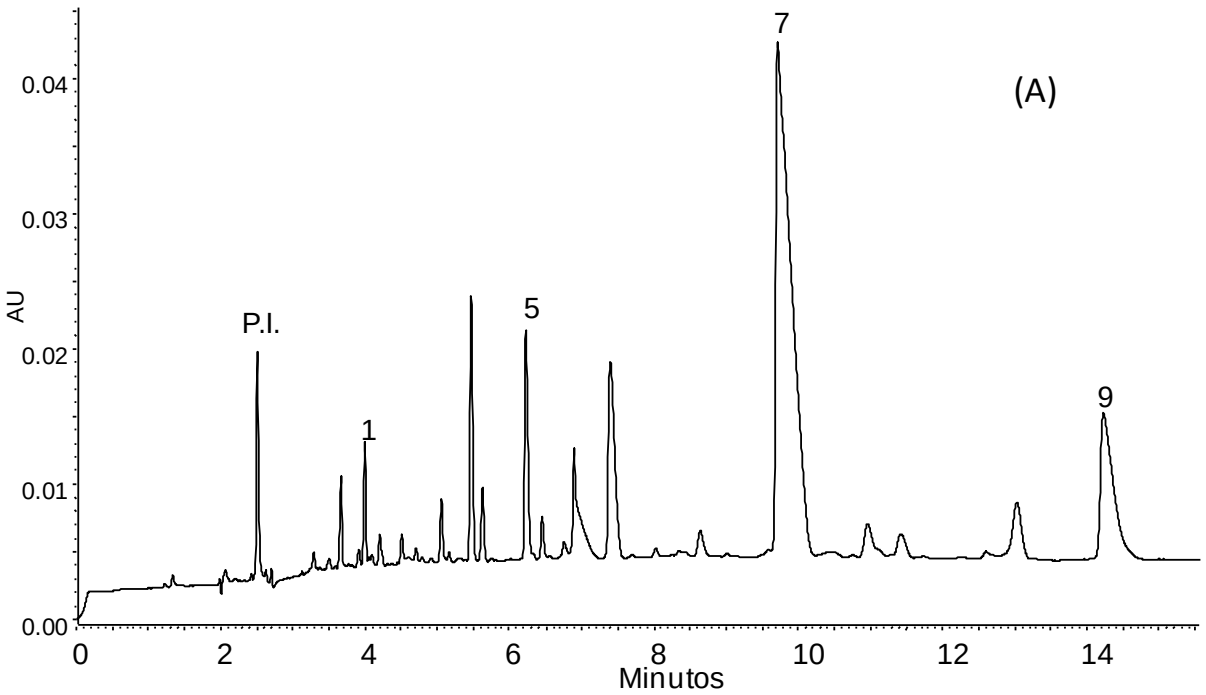


Figura 8. Eletroferogramas da fração livre (A) e fração hidrolisada (B) da fruta abiu-roxo. Condições eletroforéticas: eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, pH 9,2 e 5% (v/v) metanol; tensão aplicada de +30 kV; capilares de 50 µm d.i., 40,2 cm total; injeção 0,5 psi /5s. Identificação dos picos: ácidos (3) ferúlico, (5) *p*-cumárico, (8) gálico, e (P.I.) padrão interno de triptofano.



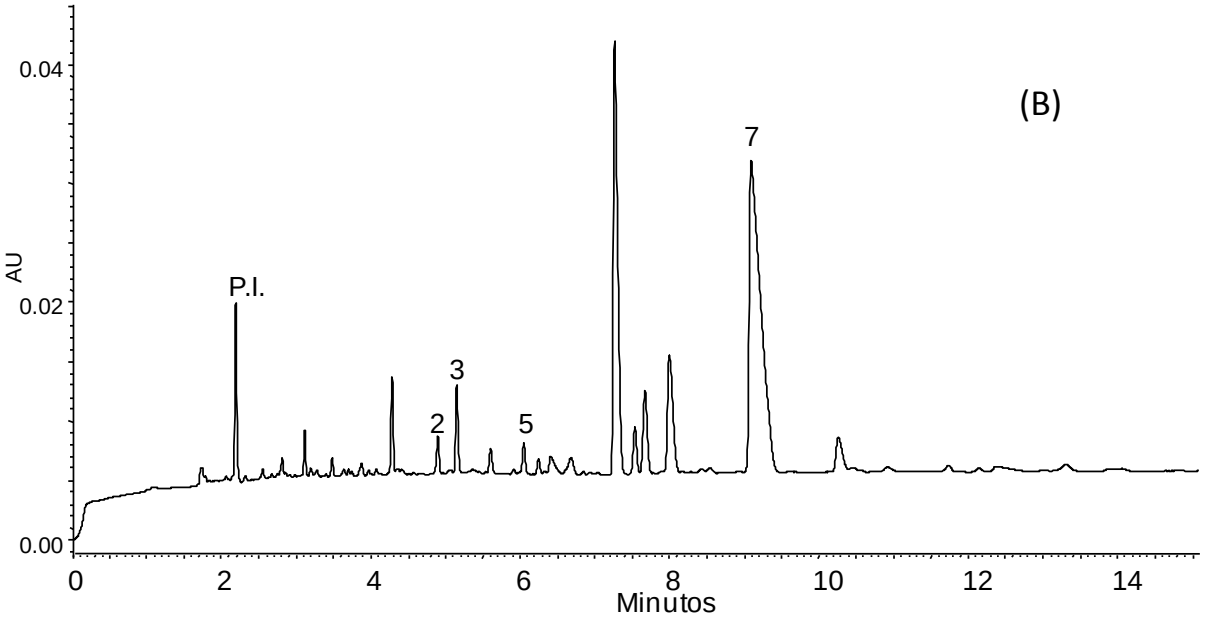


Figura 9. Eletroferogramas das frutas: amora silvestre (fração hidrolisada) (A) e tomate de árvore (fração hidrolisada) (B). Condições eletroforéticas: eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, pH 9,2 e 5% (v/v) metanol; tensão aplicada de +30 kV; capilares de 50 µm i.d., 40,2 cm; injeção 0,5 psi /5s. Identificação dos picos: ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (5) *p*-cumárico, (7) cafeico, (9) protocatecuico e (P.I.) padrão interno de triptofano.

Tabela 8. Conteúdo de ácidos fenólicos em frutas (µg g^{-1}de fruta fresca).

	Abiu - roxo		Amora silvestre		Tomate de árvore	
	Fenólicos livres	**Hidrolisados**	**Fenólicos livres**	**Hidrolisados**	**Fenólicos livres**	**Hidrolisados**
Ácido clorogênico	n.d.	n.d.	5,21±0,50	8,03±0,88	5,28±0,83	n.d.
Ácido siríngico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,23±1,04
Ácido ferúlico	n.d.	6,29±0,43	n.d.	n.d.	n.d.	1,51±0,36
Ácido *p*-cumárico	n.d.	2,03±0,43	n.d.	7,19±0,05	n.d.	0,76±0,45
Ácido vanílico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido cafeico	n.d.	n.d.	n.d.	47,31±0,98	n.d.	44,47±9,29
Ácido gálico	8,38 ± 0,25	11,4±1,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido protocatecuico	n.d.	n.d.	n.d.	6,60±0,98	n.d.	n.d.

n.d., não detectado ou abaixo do LD.

Em geral, a maior parte dos ácidos fenólicos foi encontrada na fração hidrolisada do que na fração livre, indicando que nas frutas, os ácidos fenólicos são encontrados em maior extensão na forma ligada a outros compostos. Avaliando os resultados da Tabela 7 pode-se observar que nas frações livres o ácido clorogênico ocorre tanto na amora silvestre como no tomate de árvore e somente o ácido gálico ocorre no abiu-roxo. Nenhum dos outros ácidos fenólicos estudados foi detectado na fração livre dos extratos. O ácido *p*-cumárico foi encontrado em todas as frações hidrolisadas das frutas estudadas. Dentre as amostras analisadas, somente a amora silvestre apresentou ácido protocatecuico na forma ligada. Amora silvestre e tomate de árvore são boas fontes de ácido caféico na forma ligada.

Na literatura foram encontrados poucos dados em relação à composição e propriedades das frutas sobre investigação. Luo *et al.* (Luo *et al.*, 2002) avaliou a atividade antioxidante de abiu-roxo através de ensaios de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) demonstrando que o extrato da fruta, efetuado com acetato de etila exibiu uma atividade antioxidante evidenciada. Os compostos polifenólicos do extrato foram fracionados em coluna de sílica gel e identificados por TLC, NMR e ESI-MS. No estudo em referência, foi identificada a presença do ácido gálico na fração solúvel de acetato de etila e a presença de outros flavonóides. A identificação destes compostos na forma hidrolisada não foi encontrada na literatura consultada.

Estudos sobre amora de diferentes espécies indicam que esta fruta apresenta potencial antioxidante, muitos deles atribuem esta propriedade aos compostos de antocianina devido seu alto teor (Chen *et al.*, 2006); (Hassimotto *et al.*, 2007). No entanto, o potencial antioxidante dos compostos fenólicos não antocianínicos também demonstraram alta atividade antioxidante por ensaios de captura de radicais livres (Zhang *et al.*, 2008). No trabalho citado, foram identificados os compostos de

ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido 4-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico, além de outros flavonóides, em amostras de amora (*Morus alba* L.), por LC-MS.

O tomate de árvore é uma fruta subtropical, alguns estudos envolvendo esta fruta avaliam sua propriedade antioxidante (Vasco *et al.*, 2008; Kou *et al.*, 2009). No entanto, estudos de sua composição fenólica não foram encontrados. Um estudo utilizando o extrato alcoólico cru de *C. betacea* demonstrou que a fração fenólica exibiu alta atividade de captura de radicais livres (DPPH) e apresentou pronunciado efeito na inibição da oxidação de LDL “in vitro” e o stress induzido pela citotoxidade em células neurais PC12 (Kou *et al*., 2009).

Os resultados do conteúdo de ácidos fenólicos apresentados neste trabalho contribuem para a caracterização fenólica de frutas encontradas no Brasil. Estes dados também evidenciam seu potencial antioxidante e revelam que as frutas estudadas são excelentes fontes de ácidos fenólicos podendo ser importantes candidatos como alimento nutracêutico.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, um método simples, versátil e relativamente rápido foi desenvolvido para a determinação de ácidos fenólicos em frutas nativas. O estudo de otimização da composição de eletrólito para determinação dos ácidos fenólicos foi conduzido por desenho fatorial 3^2, onde a ferramenta por decisão multicritério (baseada na função desejabilidade de Derringer) foi utilizada como função resposta. O método foi validado e considerado satisfatório para a quantificação de ácidos fenólicos em frutas nativas. Apesar do processo de extração ser mais dispendioso, ele permitiu discriminar os ácidos fenólicos livres e hidrolisados das frutas examinadas. O desempenho da metodologia analítica aplicada foi satisfatório para a inspeção da composição em ácidos fenólicos em matrizes de frutas, podendo ser implementado no controle de qualidade de frutas e possivelmente produtos derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS NETO, B. D., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2007.

BERLI, F., D'ANGELO, J., CAVAGNARO, B., BOTTINI, R., WUILLOUD, R., SILVA, M. F. (2008). Phenolic composition in grape(Vitis vinifera L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levles by capillary zone electrophoresis. ***J Agr Food Chem*** 56, 2892-2898.

BUIARELLI, F., DI BERARDINO, S., COCCIOLI, F., JASIONOWSKA, R., RUSSO, M. V. (2004). Determination of phenolic acids in olive oil by capillary electrophoresis. ***Ann Chim-Rome*** 94, 699-705.

BYSTROM, L. M., LEWIS, B. A., BROWN, D. L., RODRIGUEZ, E., OBENDORF, R. L. (2008). Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. 'Montgomery' fruits. ***Food Chem*** 111, 1017-1024.

CARRASCO-PANCORBO, A., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2006). Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. ***Electrophoresis*** 27, 2182-2196.

CARRASCO-PANCORBO, A., CIFUENTES, A., CORTACERO-RAMIREZ, S., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2007). Coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenolic acids and derivatized amino acids using N,N-dimethylacrylamide-ethylpyrrolidine methacrylate physically coated capillaries. ***Talanta*** 71, 397-405.

CHEN, P. N., CHU, S. C., CHIOU, H. L., KUO, W. H., CHIANG, C. L., HSIEH, Y. S. (2006). Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. ***Cancer Lett*** 235, 248-259.

CHEN, Z. L., KRISHNAMURTI, G. S. R., NAIDU, R. (2001). Separation of phenolic acids in soil and plant tissue extracts by co-electroosmotic capillary electrophoresis with direct UV detection. ***Chromatographia*** 53, 179-184.

DERRINGER, G., SUICH, R. (1980). Simultaneous-Optimization of Several Response Variables. ***J Qual Technol*** 12, 214-219.

EHALA, S., VAHER, M., KALJURAND, M. (2005). Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. ***J Agr Food Chem*** 53, 6484-6490.

ERDEMGIL, F. Z., SANLI, S., SANLI, N., OZKAN, G., BARBOSA, J., GUITERAS, J., BELTRAN, J. L. (2007). Determination of pK(a) values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. ***Talanta*** 72, 489-496.

GARCIA-CANAS, V., CIFUENTES, A. (2008). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. ***Electrophoresis*** 29, 294-309.

GOMEZ-CARAVACA, A. M., VERARDO, V., SEGURA-CARRETERO, A., CABONI, M. F., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. (2008). Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. ***J Chromatogr A*** 1209, 238-245.

HASSIMOTTO, N. M. A., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. (2007). Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (Morus nigra L.) growing in Brazil. ***Food Sci Technol Int*** 13, 17-25.

HELMJA, K., VAHER, M., PUESSA, T., KAMSOL, K., ORAV, A., KAIJURAND, M. (2007). Bioactive components of the hop strobilus: Comparison of different extraction methods by capillary electrophoretic and chromatographic methods. ***J Chromatogr A*** 1155, 222-229.

HERNANDEZ-BORGES, J., BORGES-MIQUEL, T., GONZALEZ-HERNANDEZ, G., RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. (2005). Rapid separation of antioxidants in food samples by coelectroosmotic CE. ***Chromatographia*** 62, 271-276.

HERRERO, M., IBANEZ, E., CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. ***J Sep Sci*** 28, 883-897.

HSIEH, C. L., YEN, G. C., CHEN, H. Y. (2005). Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. ***J Agr Food Chem*** 53, 6151-6155.

HUANG, H. Y., LIEN, W. C., CHIU, C. W. (2005). Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography methods for the analysis of phenolic compounds. ***J Sep Sci*** 28, 973-981.

JIMIDAR, M., BOURGUIGNON, B., MASSART, D. L. (1996). Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis. ***J Chromatogr A*** 740, 109-117.

KOU, M. C., YEN, J. H., HONG, J. T., WANG, C. L., LIN, C. W., WU, M. J. (2009). Cyphomandra betacea Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. ***Lwt-Food Sci Technol*** 42, 458-463.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic-Acids .1. Extraction and Purification Procedure. ***J Agr Food Chem*** 30, 330-334.

KVASNICKA, F., COPIKOVA, J., SEVCIK, R., KRATKA, J., SYNTYTSIA, A., VOLDRICH, M. (2008). Determination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC. ***Cent Eur J Chem*** 6, 410-418.

LARANJINHA, J. A. N., ALMEIDA, L. M., MADEIRA, V. M. C. (1994). Reactivity of Dietary Phenolic-Acids with Peroxyl Radicals - Antioxidant Activity Upon Low-Density-Lipoprotein Peroxidation. ***Biochem Pharmacol*** 48, 487-494.

LEA, M. A., IBEH, C., DESBORDES, C., VIZZOTTO, M., CISNEROS-ZEVALLOS, L., BYRNE, D. H., OKIE, W. R., MOYER, M. P. (2008). Inhibition of growth and induction of differentiation of colon cancer cells by peach and plum phenolic compounds. ***Anticancer Res*** 28, 2067-2076.

LODOVICI, M., GUGLIELMI, F., MEONI, M., DOLARA, P. (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. ***Food Chem Toxicol*** 39, 1205-1210.

LUO, X. D., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of Chrysophyllum cainito L. (star apple). ***J Agr Food Chem*** 50, 1379-1382.

LUTHRIA, D. L., MUKHOPADHYAY, S., KRIZEK, D. T. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. ***J Food Compos Anal*** 19, 771-777.

MATTILA, P., KUMPULAINEN, J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. ***J Agr Food Chem*** 50, 3660-3667.

NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D., COMISSO, A., SCACCINI, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. ***Food Chem*** 79, 119-124.

NDHLALA, A. R., MUCHUWETI, M., MUPURE, C., CHITINDINGU, K., MURENJE, T., KASIYAMHURU, A., BENHURA, M. A. (2008). Phenolic content and profiles of selected wild fruits of Zimbabwe: Ximenia caffra, Artobotrys brachypetalus and Syzygium cordatum. ***Int J Food Sci Tech*** 43, 1333-1337.

NESS, A. R., POWLES, J. W. (1997). Fruit and Vegetables, and Cardiovascular Disease: A Review. ***Interl J Epidemiol*** 26, 1-13.

PANCORBO, A. C., CRUCES-BLANCO, C., CARRETERO, A. S., GUTIERREZ, A. F. (2004). Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. ***J Agr Food Chem*** 52, 6687-6693.

PENG, Y. Y., YE, J. N., KONG, J. L. (2005). Determination of phenolic compounds in Perilla frutescens L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. ***J Agr Food Chem*** 53, 8141-8147.

POMPONIO, R., GOTTI, R., HUDAIB, M., CAVRINI, V. (2002). Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to Echinacea purpurea plant extracts. ***J Chromatogr A*** 945, 239-247.

PROESTOS, C., KAPSOKEFALOU, M., KOMAITIS, M. (2008). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. ***J Food Quality*** 31, 402-414.

RIEGER, G., MULLER, M., GUTTENBERGER, H., BUCAR, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of Calluna vulgaris, Sambucus nigra, and Vaccinium myrtillus. ***J Agr Food Chem*** 56, 9080-9086.

RISSO, E. M., PERES, R. G., AMAYA-FARFAN, J. (2007). Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. ***Food Chem*** 105, 1578-1582.

ROBBINS, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. ***J Agr Food Chem*** 51, 2866-2887.

RUPASINGHE, H. P. V., KEAN, C. (2008). Polyphenol concentrations in apple processing by-products determined using electrospray ionization mass spectrometry. ***Can J Plant Sci*** 88, 759-762.

SAFRA, J., POSPISILOVA, M., KAVALIROVA, A. (2006). Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids. ***J Pharmaceut Biomed*** 41, 1022-1024.

SARAJI, M., MOUSAVINIA, F. (2006). Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography-mass spectrometric detection for determination of organic acids in fruits and fruit juices. ***J Sep Sci*** 29, 1223-1229.

SIMIRGIOTIS, M. J., THEODULOZ, C., CALIGARI, P. D. S., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. (2008). Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. ***Food Chem*** 113, 377-385.

STALIKAS, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. ***J Sep Sci*** 30, 3268-3295.

STERBOVA, D., VLCEK, J., KUBAN, V. (2006). Capillary zone electrophoretic determination of phenolic compounds in chess (Bromus inermis L.) plant extracts. ***J Sep Sci*** 29, 308-313.

SZAJDEK, A., BOROWSKA, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health - Promoting Properties of Berry Fruits: A Review ***Plant Foods Hum Nutr*** 63, 147-156.

VASCO, C., RUALES, J., KAMAL-ELDIN, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. ***Food Chem*** 111, 816-823.

VINSON, J. A., SU, X. H., ZUBIK, L., BOSE, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. ***J Agr Food Chem*** 49, 5315-5321.

ZADERNOWSKI, R., CZAPLICKI, S., NACZK, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana). ***Food Chem*** 112, 685-689.

ZADERNOWSKI, R., NACZK, M., NESTEROWICZ, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. ***J Agr Food Chem*** 53, 2118-2124.

ZHANG, W., HAN, F., HE, J., DUAN, C. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and antioxidant activities of nonanthocyanin phenolics in mulberry (Morus alba L.). ***J Food Sci*** 73, C512-C518.

CAPÍTULO 3

EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS NO FRUTO DO AÇAÍ E PRODUTOS DERIVADOS POR ELETROFORESE CAPILAR

RESUMO

O açaí é o fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Mart., de origem amazônica, tem sido amplamente comercializado no país inteiro e até em outros países na forma processada ou congelada. Algumas pesquisas demonstram que o açaí apresenta uma rica composição fitoquímica e relacionam este alimento com propriedades nutracêuticas. Este trabalho caracteriza a composição de ácidos fenólicos na forma livre e hidrolisada presentes no açaí Juçara (*Euterpe precatória* Mart.), açaí do Pará (*Euterpe oleracea*) e em produtos comercias de açaí como polpa congelada e "açaí na tigela". A determinação dos ácidos fenólicos (siríngico, ferúlico, p-cumárico, benzoico, vanílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, gálico e protocatecuico) foi investigada por eletroforese capilar de zona com eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio e 7,5% (v/v) metanol. Os compostos fenólicos foram extraídos com metanol por ultrassom. A seguir, com intuito de promover o clean up da amostra e pré-concentrar a fração fenólica, o processo de extração líquido-líquido foi utilizado. O processo de hidrólise alcalina também foi adotado para avaliar o perfil dos ácidos fenólicos esterificados. O processo de recuperação da extração foi avaliado na polpa congelada de açaí obtendo-se resultados de 46±12 a 134±16 % na fração livre e de 62±29 a 134±16% na fração hidrolisada. Em açaí do Pará e seus produtos foram encontrados os ácidos siríngico, ferúlico, p-cumárico, vanílico, p-hidroxibenzoico, cafeico, gálico e protocatecuico e no açaí Juçara os ácidos siríngico, ferúlico, vanílico e protocatecuico.

1. INTRODUÇÃO

O açaí é o fruto da palmeira conhecida como açaizeiro, *Euterpe oleracea* Mart. O açaizeiro é encontrado na floresta Amazônica e destaca-se por sua importância econômica nesta região. O Pará é o maior produtor do Brasil, sendo responsável por 95% da produção do açaí, calculada em 100 a 180 mil litros/ dia, em Belém. Hoje sua expansão econômica já atinge novos mercados no sudeste do país e alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China (Menezes *et al.*, 2008). O fruto, matéria-prima para a obtenção do suco do açaí, bebida símbolo do Pará, é o principal produto oriundo da palmeira. O açaí é um fruto esférico com diâmetro de 1 a 1,5 cm e de cor púrpura. A semente constitui a maior parte do fruto e este é coberto por uma fina camada fibrosa, contendo a polpa do fruto. A polpa é separada e macerada para a obtenção de um suco viscoso. O suco é consumido principalmente pela adição de açúcar, xarope de guaraná ou outras frutas, como banana, acerola e morango (Rogez, 2000). A polpa do açaí também tem sido adicionada a outros produtos alimentícios como bebidas (Sabbe *et al.*, 2009), iogurtes (Coisson *et al.*, 2005), e sorvetes.

Grande enfoque tem sido dado ao açaí devido aos benefícios associados ao seu consumo. Vários estudos relacionados à sua composição evidenciam seu valor nutricional (Schauss *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2008). Vários estudos fitoquímicos do fruto do açaí caracterizam uma composição rica em compostos fenólicos (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Pacheco-Palencia *et al.*, 2009). Devido ao seu elevado teor em antocianinas, vários efeitos benéficos são associados a este produto (de Rosso *et al.*, 2008). As antocianinas são responsáveis pela pigmentação vermelha do fruto e demonstram efeitos terapêuticos como

atividade antiinflamatória, prevenção ao câncer, atividade vaso protetora, inibição da oxidação do LDL e diminuição dos riscos cardiovasculares (Seeram *et al.*, 2006). Entretanto, o efeito complementar, aditivo ou sinérgico de outros compostos, fenólicos pode ser atribuído às propriedades biológicas das frutas, do que serem atribuídos a um único composto (Seeram, 2008). Os ácidos fenólicos podem contribuir nas propriedades do açaí por apresentar efeitos potencialmente protetores contra alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias, em parte devido ao seu potencial antioxidante (Lea *et al.*, 2008; Szajdek e Borowska, 2008).

A extração dos ácidos fenólicos é uma etapa importante para a recuperação e isolamento dos compostos fenólicos das matrizes de plantas ou alimentos, antes da análise. Etapas adicionais são utilizadas para a remoção de outros compostos não investigados como gorduras, terpenos, clorofilas e outros compostos que podem interferir na análise. Métodos de extração líquido-líquido e sólido-líquido são amplamente utilizados para análise de fenólicos em plantas. Métodos de extração utilizando ultrassom (Novak *et al.*, 2008), soxhlet (Klejdus *et al.*, 2008), fluido super crítico (Abbasi *et al.*, 2008), micro-ondas (Waksmundzka-Hainos *et al.*, 2007), por solvente pressurizado (Skalicka-Wozniak e Glowniak, 2008) e fases sólidas (Michalkiewicz *et al.*, 2008; Klejdus *et al.*, 2009) também são utilizados.

Krygier *et al.* (1982) utilizaram uma mistura de metanol/acetona/água (7:7:6, v/v/v) para a extração de ácidos fenólicos em cereais. Posteriormente, os ácidos fenólicos do extrato foram extraídos com éter dietílico e acetato de etila. Os ácidos fenólicos esterificados foram hidrolisados com NaOH 4 mol L^{-1} e após acidificação os ácidos fenólicos liberados foram extraídos com éter dietílico e acetato de etila. A hidrólise alcalina pode levar à degradação de alguns ácidos fenólicos, particularmente os dihidroxilados (Krygier *et al.*, 1982). Entretanto, Nardini *et al.*

demonstraram que a adição de ácido ascórbico, um forte antioxidante, e EDTA, um quelante de íons metálicos, previne a perda dos ácidos fenólicos durante a hidrólise alcalina (Nardini *et al.*, 2002).

A extração em fase sólida em diferentes sorventes sólidos foi investigada por Michalkiewicz *et al.* (2008) em amostras de mel, para determinação de ácidos fenólicos e flavonóis por HPLC. Dentre as fases sólidas estudadas (Amberlite XAD-2, Strata X, Oasis HLB e octadecil C_{18}), a fase C_{18} demonstrou baixa recuperação (<30%) dos ácidos siríngico, cafeico, vanílico, gálico e *p*-hidroxibenzoico, quando eluídas com metanol. Os melhores resultados de recuperação foram obtidos com a fase Oasis HLB com valores de 54, 60 e 84% para os ácidos cafeico, siríngico e gálico, respectivamente, e de 100% para os ácidos vanílico e p-hidroxibenzoico (Michalkiewicz *et al.*, 2008).

A determinação dos compostos fenólicos no açaí tem sido realizada principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV, DAD e MS (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Gallori *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006; Schauss *et al.*, 2006; de Rosso *et al.*, 2008; Pacheco-Palencia *et al.*, 2009). A determinação de compostos fenólicos por eletroforese capilar não foi citada na literatura consultada.

Neste trabalho, a extração e avaliação do perfil de ácidos fenólicos na forma livre e hidrolisada do açaí foram efetuadas. A determinação dos ácidos fenólicos em polpa de açaí foi investigada por eletroforese capilar de zona com detecção por DAD. Estudos no processo de extração líquido-líquido foram desenvolvidos com objetivo de obter melhores condições para a recuperação dos ácidos fenólicos.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água deionizada purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Os padrões analíticos foram de diferentes procedências: o ácido clorogênico foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.); os ácidos vanílico, ferúlico, protocatecuico e *p*-cumárico foram obtidos da Fluka (Neu-Ulhm, Alemanha); o ácido siríngico da Research Chemicals Ltda; e os ácidos gálico e cafeico foram adquiridos da Espectrum. Os padrões foram dissolvidos em etanol na concentração final de 1000 μg mL^{-1} e armazenados sob refrigeração, perfazendo as soluções estoque.

Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente antes do uso, utilizando-se solução estoque de 100 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, adquirido da Merck (Darmstadt – Alemanha). O solvente metanol foi de grau cromatográfico, obtido da Tedia (Fairfield – E.U.A.). Um eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, pH 9,2 e 7,5% (v/v) de metanol foi utilizado na análise das amostras.

2.2 Instrumentação

Todos os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, U.S.A.) equipado com detetor do tipo DAD, com detecção direta fixada a 200 nm, controle de temperatura por líquido refrigerante e programa de aquisição e tratamento de dados (32 Karat™). As injeções das amostras foram realizadas hidrodinamicamente a 0,5

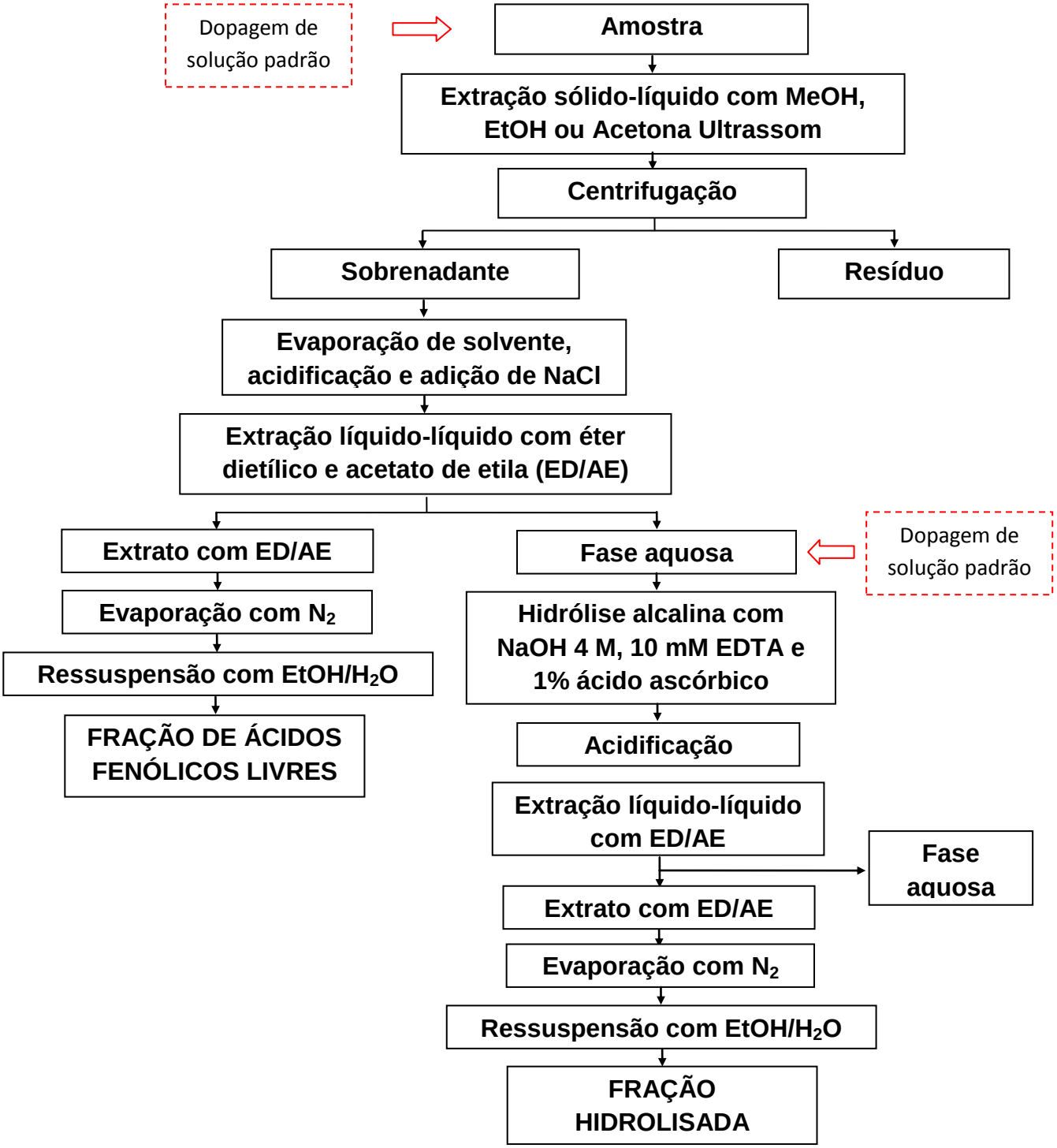
psi por 5 s. O sistema eletroforético foi operado com polaridade normal e tensão de 30 kV.

Os capilares utilizados nos experimentos foram constituídos de sílica fundida, revestidos externamente com poli-imida, com 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. A temperatura do capilar foi controlada por sistema de refrigeração mantida a 25º C. O comprimento total do capilar utilizado foi de 40,2 cm e o comprimento efetivo de 30 cm. O condicionamento inicial do capilar foi efetuado através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (20 psi/30 min) e água deionizada (20 psi/30 min). O condicionamento do capilar no início de cada dia foi feito através de lavagem com NaOH 1 mol L^{-1} (20 psi/10 min), água (20 psi/10 min) e o eletrólito de corrida (20 psi/5 min). No final do dia o capilar foi lavado com NaOH 1 mol L^{-1} (20 psi/5 min) e água (20 psi/5 min). No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com soluções do eletrólito de corrida (20 psi/3 min).

2.3 Preparo das amostras e método de extração

As amostras de polpa de açaí congelada comercial e doces de açaí (açaí na tigela) foram obtidas de mercado local e armazenadas a -5°C até o preparo. O açaí Juçara foi colhido da palmeira *Euterpe precatoria* Mart. encontrado na mata nativa no Estado de São Paulo e armazenado a -5°C. O açaí do Pará foi colhido da palmeira *Euterpe oleracea* no Estado do Pará e enviado a São Paulo, via correio, no mesmo dia e, posteriormente, armazenado a -5°C. O método de extração dos ácidos fenólicos foi adaptado do método proposto por Krygier *et al.* (Krygier *et al.*, 1982). As amostras de frutas, açaí Juçara e açaí do Pará, foram descongeladas em temperatura ambiente, a polpa foi separada da semente (manualmente), pesada (cerca de 6 g) e posteriormente triturada em Ultra-Turrax, contendo 6 mL de água.

Devido o alto teor de gorduras das polpas de frutas de açaí preparadas em laboratório, estas foram desengorduradas pela adição de 5 mL de hexano, 3 vezes. A fração lipofílica foi descartada. As amostras congeladas de polpa e produtos derivados de açaí foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas e pesadas (cerca de 12 g). Diferentes solventes como metanol, etanol e acetona foram estudados para extração. Estes solventes foram adicionados às amostras na propoção de 1:1. As misturas foram submetidas ao ultrassom por 15 min e depois centrifugadas a 9352 g por 10 min. O sobrenadante foi separado e evaporado em rotavapor a 30°C para a retirada do solvente orgânico e redução do volume. A suspensão aquosa foi acidificada com HCl concentrado a pH 2-3 para liberar os ácidos fenólicos livres. Em seguida, a solução foi saturada com cloreto de sódio e os ácidos fenólicos livres foram extraídos 3 vezes com éter dietílico e acetato de etila 50:50 v/v na proporção de 1:1 extrato - mistura de solvente. As frações da fase orgânica foram separadas da fase aquosa e combinadas para evaporação sob fluxo de nitrogênio. Os compostos fenólicos foram ressuspensos em 1 mL de etanol : água (1:1) e filtrados em membrana 0,45 µm. A esta solução foi adicionado o padrão interno seguida da injeção da amostra em sistema de eletroforese capilar. A fase aquosa remanescente foi hidrolisada com NaOH 4 mol L^{-1} contendo 10 mmol L^{-1} de EDTA e 1% de ácido ascórbico, por 12 horas, sob refrigeração (Nardini *et al.*, 2002). Posteriormente, os ácidos fenólicos hidrolisados foram extraídos e preparados da mesma maneira que os ácidos fenólicos livres. O Esquema 1 ilustra resumidamente os procedimentos de extração descritos.



Esquema 1. Procedimento de extração dos ácidos fenólicos nas amostras de açaí.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação dos ácidos fenólicos na matriz de açaí e produtos derivados foi aplicado o método validado no capítulo anterior. Entretanto, devido à interferência da matriz no tempo de migração do padrão interno triptofano, foi necessário adicionar outro composto como padrão interno, com migração diferenciada. Assim, o ácido 4-bromobenzóico foi utilizado como padrão interno para quantificação das amostras de açaí e produtos derivados. A Figura 1 demonstra a separação otimizada contendo o padrão interno de ácido 4-bromobenzoico.

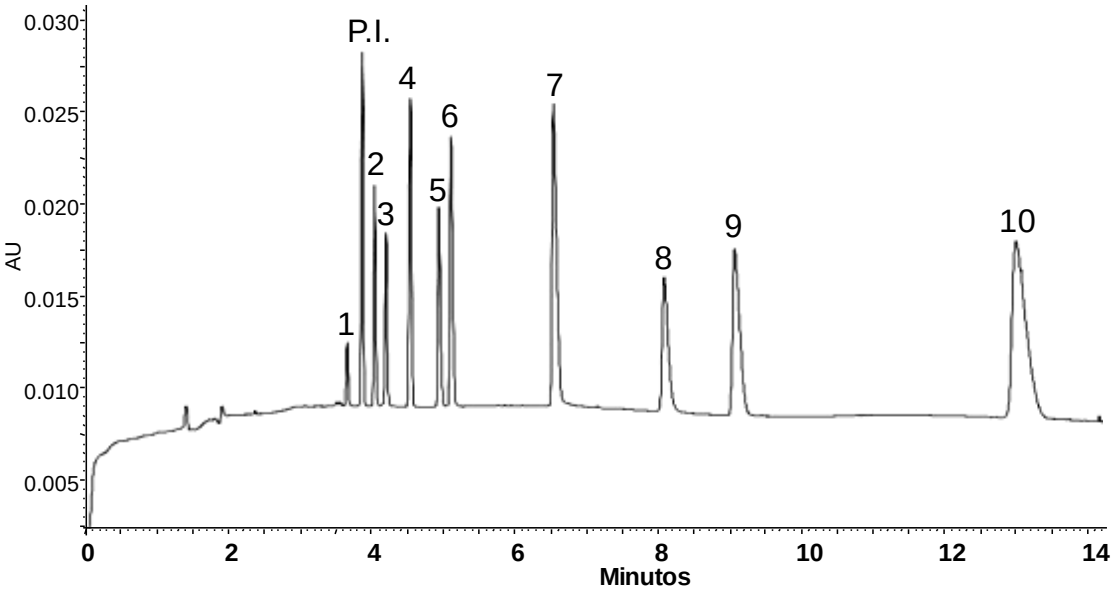


Figura 1. Eletroferograma dos padrões de ácidos fenólicos na condição otimizada: 50 mmol L^{-1} de TBS, 7,5% MeOH (v/v), pH 9,23. Outras condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 5 s; tensão aplicada de 30 kV; 25º C; capilar de 50 µm d.i. e comprimento total de 40,2 cm; detecção a 200 nm. Solução de padrões contendo 40 µg mL^{-1} de ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) *p*-hidroxibenzoico, (8) cafeico, (9) gálico e (10) protocateuico e 50 µg mL^{-1} de ácido 4-bromobenzoico como padrão interno (P.I.).

Curvas analíticas foram construídas nas concentrações de 10 – 100 µg mL^{-1} (exceto para o ácido clorogênico, que apresentou linearidade na faixa de 10 - 75 µg

mL^{-1}), contendo padrão interno (50 µg mL^{-1} de ácido 4-bromobenzóico). A Tabela 1 apresenta os resultados de regressão obtidos.

Os compostos fenólicos encontram-se distribuídos nos tecidos celulares das plantas e frutas. Os fenólicos insolúveis estão presentes nas paredes celulares enquanto que os compostos solúveis encontram-se entre os vacúolos celulares das plantas. A solubilidade dos fenólicos depende de sua natureza química na planta e pode variar com o grau de associação a outros compostos. Os ácidos fenólicos podem estar associados a outras moléculas como carboidratos e proteínas. Além disso, a solubilidade dos ácidos fenólicos pode ser afetada pela polaridade e tipo de solvente utilizado (Naczk e Shahidi, 2006).

A análise direta de amostras de frutas utilizando somente a extração sólido-líquido com solvente, após centrifugação, apresentou grande interferência com absorção a 200 nm de outros componentes presentes na amostra, não permitindo a identificação ou detecção dos ácidos fenólicos nas condições de eletroforese capilar otimizadas no capítulo anterior. A determinação dos ácidos fenólicos nas amostras de frutas por eletroforese capilar foi possível devido ao processo de extração líquido-líquido. A extração líquido-líquido promoveu um “clean-up” da amostra e a pré-concentração dos ácidos fenólicos.

Tabela 1. Resultados de regressão das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

ÁCIDO FENÓLICO	COEFICIENTE LINEAR	INCLINAÇÃO DA RETA	R^2	F	*p*	EP	LD* ($\mu g\ mL^{-1}$)	LQ** ($\mu g\ mL^{-1}$)
Ác. clorogênico	-0,0051 ± 0,0026	0,0050 ± $4,29 \cdot 10^{-5}$	0,9988	13710	$7x10^{-25}$	0,0058	1,71	5,18
Ác. siríngico	-0,030 ± 0,0094	0,0158 ± 0,00016	0,9988	10294	$7x10^{-24}$	0,021	1,97	5,98
Ác. ferúlico	-0,0076 ± 0,0051	0,013 ± $8,43 \cdot 10^{-5}$	0,9998	22454	$1x10^{-26}$	0,011	1,34	4,05
Ác. benzoico	0,0097 ± 0,0071	0,025 ± 0,00012	0,9979	42456	$3x10^{-27}$	0,015	0,92	2,79
Ác. *p*-cumárico	-0,016 ± 0,010	0,017 ± 0,00018	0,9986	9422	$2x10^{-22}$	0,022	1,96	5,93
Ác. vanílico	-0,025 ± 0,015	0,026 ± 0,00025	0,9994	10981	$4x10^{-24}$	0,033	1,91	5,79
Ác. *p*-hidroxibenzoico	-0,010 ± 0,046	0,0515 ± 0,00079	0,9993	4302	$2x10^{-8}$	0,046	2,97	9,02
Ác. cafeico	-0,018 ± 0,013	0,023 ± 0,00022	0,9996	10982	$4x10^{-24}$	0,029	1,91	5,79
Ác. gálico	-0,018 ± 0,022	0,034 ± 0,00036	0,9995	9023	$2x10^{-23}$	0,049	2,11	6,39
Ác. protocatecuico	0,011 ± 0,049	0,053 ± 0,00080	0,9994	4310	$7x10^{-21}$	0,108	3,05	9,24

EP erro padrão da regressão
*LD = 3.3x(desvio padrão do intercepto/inclinação da reta)
**LQ = 10x(desvio padrão do intercepto/inclinação da reta)

O processo de extração líquido-líquido é comumente usado por ser uma técnica prática e amplamente usada para diferentes compostos. Os solventes mais utilizados são metanol, etanol, acetona, éter etílico e acetato de etila (Stalikas, 2007). De acordo com Krigier *et al.* (1982) o melhor solvente para extração dos ácidos fenólicos foi uma mistura de éter etílico e acetato de etila. Neste trabalho, a adição de cloreto de sódio à solução aquosa antes da extração líquido-líquido foi incluída no processo de extração. Esta adição promove um processo de “salting-out” que diminui a solubilidade dos compostos orgânicos na água e aumenta sua transferência para os solventes orgânicos de extração.

A hidrólise de éster gerando ácido carboxílico é uma estratégia que tem sido utilizada para avaliar o perfil dos ácidos fenólicos em alimentos, uma vez que estes compostos podem estar indisponíveis, por estarem ligados a outras substâncias. A hidrólise pode ser feita em meio ácido, básico ou enzimático (Robbins, 2003). Gao e Mazza estudaram diferentes condições de hidrólise ácida para ácidos fenólicos e obteve rendimentos de 30 a 65% utilizando HCl e metanol (1:1, v/v) a 100°C, por 1 hora (Gao e Mazza, 1994). Entretanto, Krigier *et al.* reportou perdas nos teores de alguns ácidos fenólicos em condições ácidas (Krygier *et al.*, 1982). A hidrólise básica é um processo de saponificação pelo tratamento da amostra com uma solução de hidróxido de sódio. As condições reportadas variam em relação ao tempo, temperatura e concentração de NaOH. A hidrólise alcalina pode levar à degradação de alguns ácidos hidroxicinâmicos. Entretanto, Nardini *et al*. demonstraram que a adição de ácido ascórbico, um forte antioxidante, e EDTA, um quelante de metais, previne a perda dos ácidos fenólicos durante a hidrólise alcalina (Nardini *et al.*, 2002).

Neste trabalho, foi avaliado o teor de ácidos fenólicos da polpa de açaí na fração livre e hidrolisada. O processo de hidrólise básica foi de acordo com Nardini *et al.,* para evitar processos de decomposição nesta etapa (Nardini *et al.*, 2002).

Para estudo de extração sólido-líquido dos ácidos fenólicos do açaí, inicialmente foi avaliado o efeito de diferentes solventes na etapa inicial de extração por ultrassom (Tabela 2). Para este estudo um mesmo lote de polpa de açaí congelada foi fracionado em diferentes porções de 6 g e extraídos com etanol, acetona e metanol. Para avaliar o grau de extração dos diferentes solventes, os ácidos fenólicos endógenos de cada extrato foram quantificados e comparados. As médias dos teores em triplicata de extração foram comparadas por teste de Tukey (ANOVA). As médias dos teores de cada ácido fenólico foram comparadas entre os diferentes solventes utilizados para extração nas frações livres e hidrolisadas. Médias seguidas da mesma letra não diferenciam entre si estatisticamente (p<0,05).

De acordo com a Tabela 2, a extração com metanol na proporção de 1:1 solvente e amostra (v/v) proporcionou maiores teores de ácidos fenólicos em alguns casos: extração do ácido siríngico na fração livre e do ácido vanílico na fração hidrolisada. De acordo com a literatura consultada, diferentes condições de extração foram utilizadas para diferentes amostras. Krygier *et al.* obteve melhores resultados de extração de ácidos fenólicos em sementes de oleaginosas utilizando uma mistura metanol-acetona-água, 7:7:6 (Krygier *et al.*, 1982). Kähkönen *et al.* obteve melhores condições de extração em amostras de frutas liofilizadas (berries) com uma mistura de acetona aquosa 70% (Kahkonen *et al.*, 2001). As condições de extração variam para cada tipo de amostra, a presença de água é importante para amostras com baixo teor de umidade ou liofilizadas, neste caso, como as amostras estudadas apresentavam alto teor de água (89% de umidade), a adição de solvente puro para

extração foi eficaz para a extração dos ácidos fenólicos. Estudos de extração na amostra liofilizada da polpa do açaí foram efetuados, entretanto, os teores de ácidos fenólicos foram menores em relação à amostra congelada dentro das condições estudadas (extração em metanol:água 50% v/v).

Tabela 2. Diferentes solventes utilizados na extração (proporção 1:1, solvente: volume de amostra) por ultrassom dos ácidos fenólicos da polpa do açaí*.

Ácidos fenólicos	**Fração Livre****			**Fração Hidrolisada****		
	Etanol	Acetona	Metanol	Etanol	Acetona	Metanol
Ac. Siríngico	$4,8^{b} \pm 1,4$	$4,1^{b} \pm 0,4$	$11^{a} \pm 1$	$4,4^{a} \pm 0,7$	$5,6^{a} \pm 1,0$	$7,0^{a} \pm 2,0$
Ac. Ferúlico	$1,7^{a} \pm 0,04$	$2,2^{a} \pm 0,4$	$1,7^{a} \pm 0,1$	$2,4^{a} \pm 0,6$	$1,5^{a} \pm 0,4$	$2,5^{a} \pm 0,6$
Ác. Benzoico	$42^{a} \pm 1$	$49^{a} \pm 1$	$51^{a} \pm 8$	$1,1^{a} \pm 0,3$	$2,1^{a} \pm 0,4$	$1,5^{a} \pm 0,6$
Ác. *p*-cumárico	-	-	-	$1,4^{a} \pm 0,4$	$1,4^{a} \pm 0,3$	$2,4^{a} \pm 0,5$
Ác. Vanílico	$5,3^{a} \pm 0,4$	$5,0^{a} \pm 0,3$	$8,3^{a} \pm 1,7$	$1,9^{b} \pm 0,4$	$2,0^{b} \pm 0,2$	$3,2^{a} \pm 0,1$
Ác. Protocatecuico	$4,1^{a} \pm 0,5$	$3,8^{a} \pm 0,1$	$4,3^{a} \pm 0,7$	$7,1^{a} \pm 1,1$	$6,1^{a} \pm 1,5$	$8,1^{a} \pm 2,5$

* Teores de ácidos fenólicos em $\mu g\ g^{-1}$ de fruta.
**Médias ± desvio padrão em triplicata, valores na mesma linha e no mesmo tipo de fração (livre ou hidrolisada) com mesma letra não diferem entre si estatisticamente ($p<0.05$).

A Figura 2 A e B ilustram os eletroferogramas da polpa de açaí nas frações livre e hidrolisada. A diferença nos tempos de retenção na fração livre em relação à fração hidrolisada foi devido ao menor potencial aplicado (20 kV). A diminuição da tensão aplicada influencia o campo elétrico aplicado e consequentemente o fluxo eletrosmótico, promovendo o aumento do tempo de retenção dos analitos. A aplicação desta tensão foi necessária na fração livre com objetivo de aumentar a resolução entre o pico de ácido vanílico (pico 6) e o pico interferente posterior.

Baseado nas modificações efetuadas e discutidas anteriormente, o estudo de recuperação dos ácidos fenólicos foi efetuado na matriz de polpa de açaí congelado. Os padrões de ácidos fenólicos foram adicionados à matriz e o processo de recuperação foi avaliado nas frações livre e hidrolisada. Para a fração livre, os padrões foram adicionados na amostra inicial (Esquema 1), enquanto que para a fração hidrolisada os padrões foram adicionados na fase aquosa proveniente da extração líquido-líquido (Esquema 1). A Tabela 3 apresenta a quantificação dos ácidos fenólicos presentes na polpa de açaí, os teores adicionados na polpa e a taxa de recuperação destes compostos. Os teores de padrões de ácidos fenólicos adicionados à polpa foram estimados com base nos teores encontrados originalmente na polpa (cerca de 50% do teor encontrado) e de até 1,5 µg g^{-1} de cada padrão, quando ausentes na polpa. O teor adicionado de ácido clorogênico foi maior, por ter sido observado resultados divergentes de recuperação em ensaios prévios.

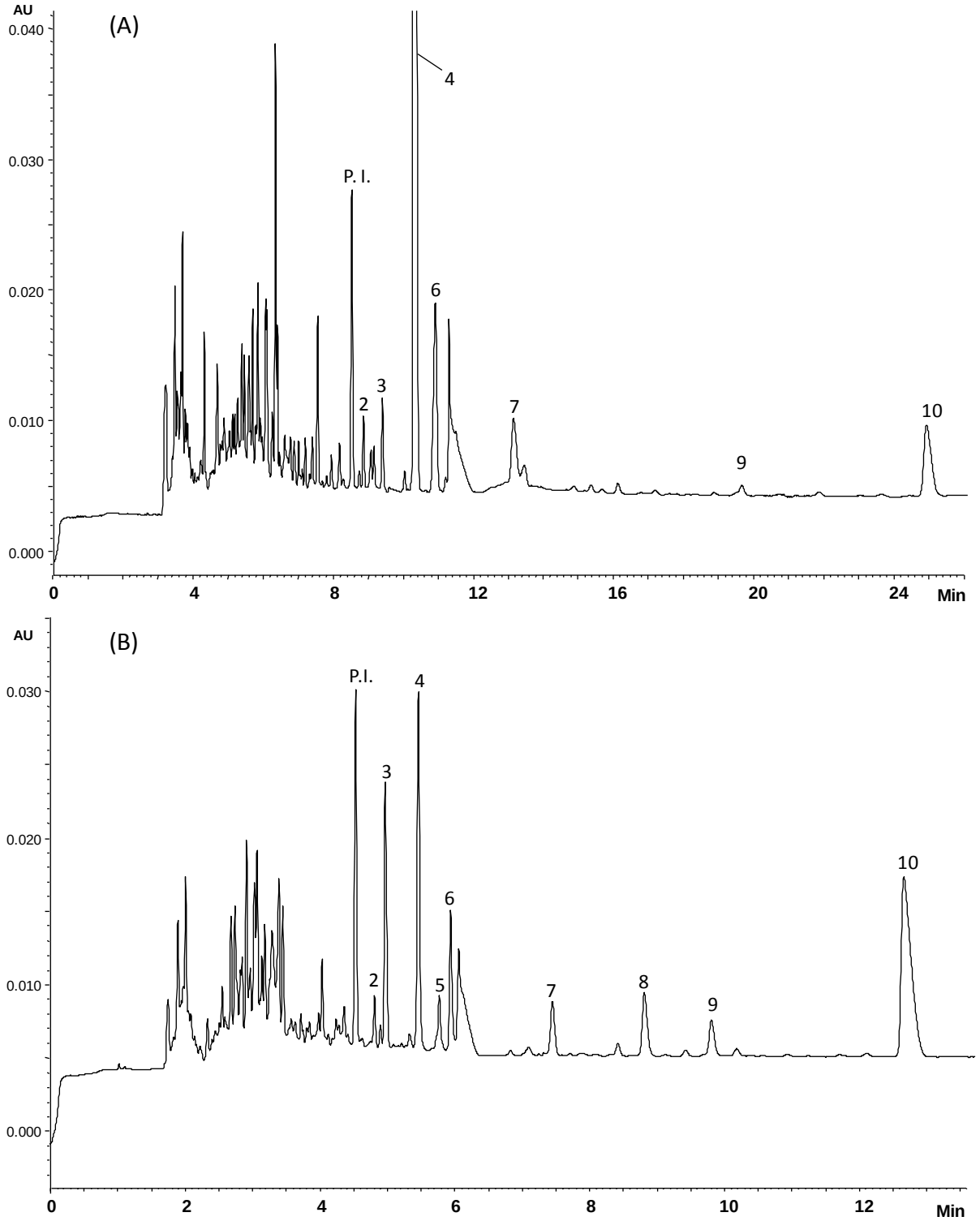


Figura 2. Eletroferogramas das frações livre (A) e hidrolisada (B) da polpa de açaí. Condições eletroforéticas: eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} tampão tetraborato, pH 9,2 e 7,5% (v/v) metanol; tensão aplicada de 20kV (A) e 30 kV (B); capilar de 50 µm d.i. e comprimento total de 40,2 cm; detecção a 200 nm. Identificação de picos: ácidos (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) *p*-hidroxibenzoico, (8) cafeico, (9) gálico, (10) protocateuico e (P.I.) padrão interno de 50 µg mL^{-1} de ácido 4-bromobenzoico.

Tabela 3. Teores de ácidos fenólicos em amostra de polpa de açaí congelado e teores de recuperação.

Ácidos fenólicos	**Fração Livre**			**Fração Hidrolisada**		
	Teor encontrado (μg g^{-1})	Teor adicionado (μg g^{-1})	Recuperação (%)	Teor encontrado (μg g^{-1})	Teor adicionado (μg g^{-1})	Recuperação (%)
Ácido clorogênico	-	2,8	77 ± 7	-	2,8	-
Ácido siríngico	4,3 ± 0,1	2,0	78 ± 3	1,4 ± 0,1	2,0	85 ± 12
Ácido ferúlico	2,4 ± 0,1	1.5	115 ± 23	10 ± 0,4	5,0	80 ± 4
Ácido benzoico	64 ± 3	10	46 ± 12	0,84 ± 0,12	1,0	82 ± 9
Ácido p-cumárico	-	1,5	97 ± 18	1,9 ± 0,1	1,0	98 ± 6
Ácido vanílico	12 ± 0,3	3,0	97 ± 7	1,1 ± 0,2	1,0	101 ± 16
Ácido p-hidroxibenzoico	3,3 ± 0,1	1,5	99 ± 2	0,76 ± 0,11	1,0	110 ± 10
Ácido cafeico	-	1,5	85 ± 4	2,2 ± 0,7	1,4	132 ± 11
Ácido gálico	0,44 ± 0,08	1,0	60 ± 2	0,55 ± 0,24	1,5	62 ± 29
Ácido protocatecuico	3,0 ± 0,0	1,5	110 ± 9	2,7 ± 0,1	1,5	125 ± 20

Na fração livre, porcentagens de recuperação dos ácidos fenólicos de 46 a 115% foram encontrados. Os ácidos benzoico e gálico apresentaram baixa porcentagem de recuperação de 46 % e 60 %, respectivamente. Bons resultados foram encontrados para os ácidos clorogênico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico, vanílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico e protocatecúico com recuperações de 77 a 115 %.

Na fração hidrolisada as recuperações variaram de 62 a 132 % e não houve recuperação para o ácido clorogênico. O ácido clorogênico não foi recuperado na fase hidrolisada por sofrer modificações em sua estrutura devido ao processo de hidrólise. A molécula do ácido clorogênico (ácido 5-o-cafeoilquínico) é constituída de uma molécula de ácido cafeico esterificada com o ácido quínico. O ácido clorogênico pode ter sido hidrolisado, assim, promovendo um aumento no teor de ácido cafeico, que apresentou recuperação alta, 132 %. Outra possibilidade existente é a transformação do ácido clorogênico em seus isômeros, pois de acordo com Trugo e Macrae os isômeros do ácido clorogênico podem ser obtidos pela elevação do pH a 8,0 com solução alcalina e posterior ajuste de pH para 2,5 - 3,0 com HCl (Trugo e Macrae, 1984). A investigação da presença destes isômeros na fração hidrolisada poderia ser efetuada, entretanto, devido à ausência de padrões comerciais de ácido 3-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico, esta determinação não foi efetuada.

Bons resultados de recuperação na fração hidrolisada foram obtidos para os ácidos siríngico, ferúlico, benzoico, *p*-cumárico, vanílico, p-hidroxibenzoico, cafeico e protocatecúico com taxas de recuperação de 80 a 132 %. Entretanto, a recuperação para ácido gálico foi de 62 %, no mesmo nível que na fração livre. A perda deste composto pode ter ocorrido devido às condições de hidrólise ou devido a processos de oxidação. Como discutido acima, o ácido cafeico apresentou uma alta

recuperação de 132 %, possivelmente este aumento foi devido ao processo de hidrólise da molécula de ácido clorogênico. Poucos trabalhos discutem os processos de recuperação, alguns artigos de revisão não encontram coerência nos dados de extração, muitos dos processos de extração não são eficazes para todos os compostos fenólicos estudados (Robbins, 2003; Naczk e Shahidi, 2006; Stalikas, 2007).

Com intuito de avaliar o fenômeno de partição dos analitos durante a etapa de extração líquido-líquido, foi efetuada a extração de ácidos fenólicos a partir de soluções aquosas contendo diferentes concentrações de ácidos fenólicos, através da adição de uma mistura de solventes orgânicos: acetato de etila e éter dietílico. A Tabela 4 demonstra o percentual de ácidos fenólicos extraídos na fase orgânica a partir de soluções aquosas contendo 10, 20 e 30 µg mL^{-1} de cada ácido fenólico.

Tabela 4. Teor de ácidos fenólicos extraídos na fase orgânica, após extração líquido-líquido a partir de soluções aquosas contendo diferentes concentrações (10, 20 e 30 µg mL^{-1}) de padrões ácidos fenólicos.

Ácidos fenólicos	Recuperação (%)		
	10 µg mL^{-1}	20 µg mL^{-1}	30 µg mL^{-1}
Ácido clorogênico	70 ± 2	72 ± 3	49 ± 6
Ácido siríngico	93 ± 4	113 ± 5	88 ± 1
Ácido ferúlico	95 ± 2	99 ± 6	84 ± 1
Ácido benzoico	58 ± 8	54 ± 10	40 ± 1
Ácido *p*-cumárico	93 ± 3	96 ± 4	84 ± 1
Ácido vanílico	96 ± 2	102 ± 3	91 ± 1
Ácido *p*-hidroxibenzoico	95 ± 2	94 ± 3	92 ± 2
Ácido cafeico	84 ± 2	79 ± 3	86 ± 1
Ácido gálico	85 ± 1	89 ± 2	90 ± 2
Ácido protocatecuico	87 ± 3	89 ± 6	88 ± 2

Com o experimento de recuperação dos padrões em fase aquosa foi possível verificar perdas no processo de extração para os ácidos clorogênico e benzoico. As taxas de recuperação para o ácido benzoico foram de 40 a 58 %. O ácido benzóico por ser o composto mais polar desta classe demonstrou ter baixa partição com a fase orgânica utilizada. Este resultado está de acordo com o valor observado na recuperação do ácido benzoico na matriz de polpa de açaí que foi de 46 % (Tabela 3). Já na fração hidrolisada a recuperação de 82 % foi considerada alta (Tabela 3), entretanto este valor pode ser decorrente às taxas remanescentes de padrão adicionadas na etapa anterior (ácidos fenólicos livres). Em relação ao ácido clorogênico, uma recuperação de 49 a 72 % foi verificada. Contudo, neste caso a perda deste composto provavelmente foi decorrente à sua instabilidade uma vez que foi observada a formação de um pico desconhecido após o processo de acidificação e partição em solvente.

A Tabela 5 apresenta os teores de ácidos fenólicos contidos no fruto do açaí do Pará (*Euterpe oleracea* Mart.), açaí Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e de um produto comercial de açaí (açaí na tigela). A Figura 3 ilustra o perfil eletroforético dos ácidos fenólicos hidrolisados das amostras de açaí Juçara e açaí do Pará.

Tabela 5. Teores de ácidos fenólicos em amostras de açaí Juçara, açaí do Pará e sobremesa de açaí (açaí na tigela).

	Açaí Juçara (µg g^{-1})		**Açaí do Pará (µg g^{-1})**		**Sobremesa de açaí (µg g^{-1})**	
Ácidos Fenólicos	**Fração livre**	**Fração hidrolisada**	**Fração livre**	**Fração hidrolisda**	**Fração livre**	**Fração hidrolisada**
Ácido clorogênico	-	-	-	-	-	-
Ácido siríngico	-	5,2 ± 0,5	1,8 ± 0,04	3,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2	-
Ácido ferúlico	-	11 ± 1	1,4 ± 0,2	26 ± 1	1,4 ± 0,2	2,8 ± 0,1
Ácido benzoico	-	-	-	-	0,35 ± 0,1	0,66 ± 0,04
Ácido *p*-cumárico	-	-	-	3,8 ± 0,6	0,31 ± 0,09	0,34 ± 0,04
Ácido vanílico	-	12 ± 1	2,1 ± 0,2	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,2	0,51 ± 0,10
Ácido p-hidroxibenzoico	-	-	1,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2	-	-
Ácido cafeico	-	-	-	2,7 ± 0,4	0,43 ± 0,08	0,66 ± 0,01
Ácido gálico	-	-	-	0,26 ± 0,02	-	-
Ácido protocatecuico	17 ± 0,1	54 ± 3	1,6 ± 0,1	5,9 ± 0,4	2,4 ± 0,5	1,5 ± 0,2

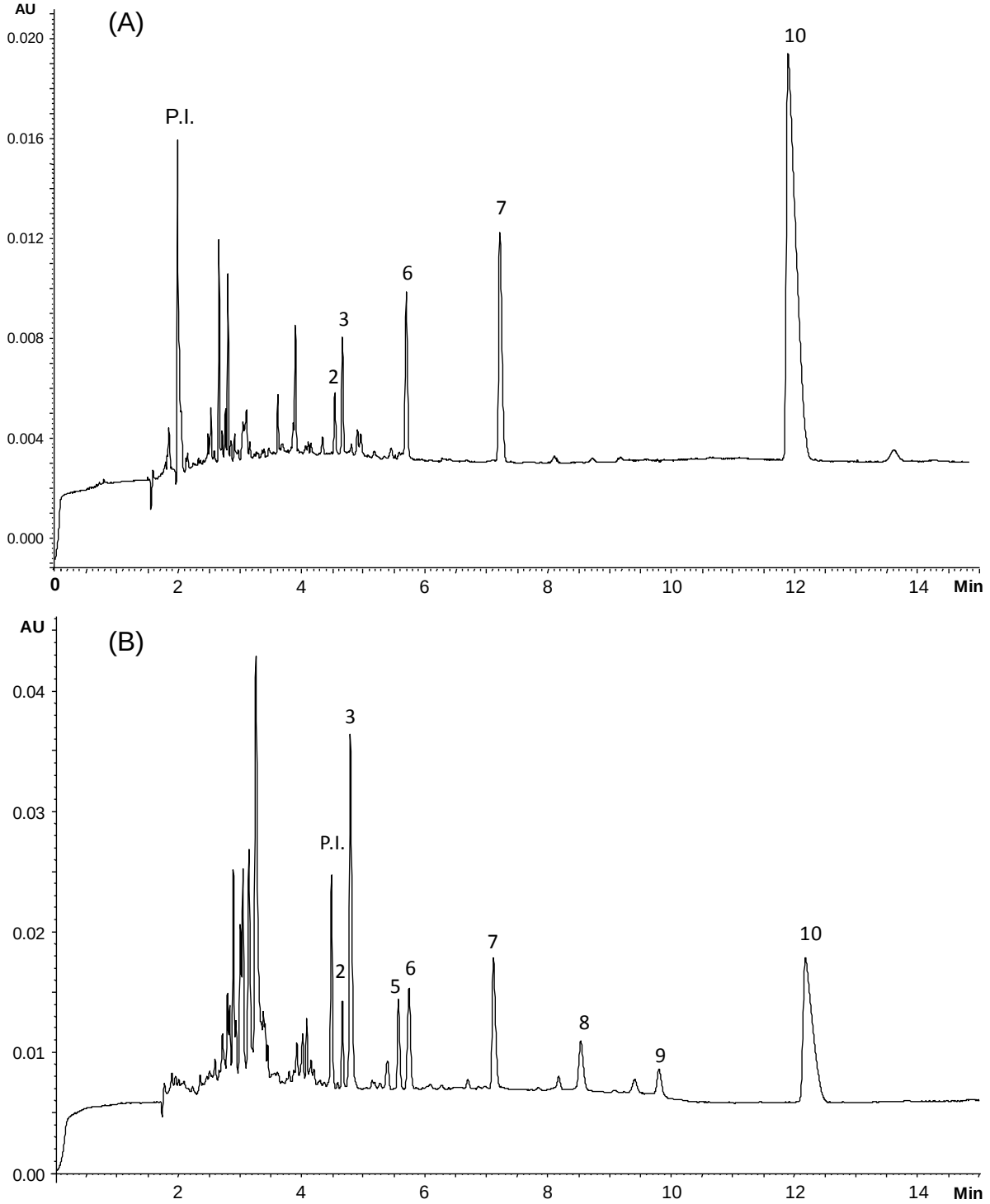


Figura 3. Eletroferogramas da fração hidrolisada do açaí Juçara (*Euterpe precatoria* Mart.) (A) e do açaí do Pará (*Euterpe oleracea* Mart.) (B). Condições eletroforéticas: eletrólito composto por 50 mmol L^{-1} tampão tetraborato pH 9,2 e 7,5% (v/v) metanol; tensão aplicada, 20kV, capilares de 50 µm d.i., comprimento total de 40,2 cm; injeção 0.5 psi/5s. Identificação de pico: (1) clorogênico, (2) siríngico, (3) ferúlico, (4) benzoico, (5) *p*-cumárico, (6) vanílico, (7) *p*-hidroxibenzoico, (8) cafeico, (9) gálico e (10) protocateuico; (P.I.) padrão interno de 40,0 µg mL^{-1} de triptofano em (A) e 50 µg mL^{-1} de ácido 4-bromobenzoico em (B).

O açaí Juçara é o fruto obtido da palmeira *Euterpe edulis* Mart., que é encontrado desde o sul do estado da Bahia até o norte do estado do Rio Grande do Sul, entretanto o fruto desta palmeira não é comercializado. A determinação dos ácidos fenólicos deste fruto demonstrou altos teores de ácidos fenólicos na fração hidrolisada. Na fração livre, o ácido protocatecuico (17,5 µg g^{-1} ±1,04) foi o único ácido fenólico sob investigação encontrado, outros compostos não foram detectados nesta fração. Na fração hidrolisada foram encontrados os ácidos siríngico, ferúlico, vanílico e protocatecuico, com teores de 5,18 a 54,3 µg g^{-1}. Recentemente, Borges *et. al* determinaram a composição fenólico de açaí Juçara de diferentes regiões de Santa Catarina por HPLC e identificaram os ácidos ferúlico, gálico, protocatecuico e *p*-cumárico (Borges *et al.*, 2011). Entretanto, o trabalho citado não efetuou processo de hidroliso na extração. Diferenças da composição fenólica também podem ser atribuídas às diferenças de condições climáticas e região de crescimento (Shahidi e Naczk, 2004).

O açaí do Pará demonstrou uma maior diversidade na composição em ácidos fenólicos em relação ao açaí Juçara. Na fração livre foram encontradas os ácidos siríngico, ferúlico, vanílico, *p*-hidroxibenzoico e protocatecuico com teores de 1,3 a 2,1 µg g^{-1}. Na fração hidrolisada, foram encontrados os ácidos siríngico, ferúlico, p-cumárico, vanílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, gálico e protocatecuico, com teores de 0,26 a 26 µg g^{-1}. Pacheco-Palencia *et al.* determinaram a composição fitoquímica de *Euterpe oleracea* por HPLC-ESI-MS. Os ácidos fenólicos encontrados no trabalho citado foram: protocatecuico (1,77 µg g^{-1}), *p*-hidroxibenzoico (1,8 µg g^{-1}), vanílico (5,05 µg g^{-1}), siríngico (4,02 µg g^{-1}) e ferúlico (0,98 µg g^{-1}) nas respectivas concentrações (Pacheco-Palencia *et al.*, 2009). Neste trabalho foram encontrados oito tipos de ácidos fenólicos enquanto que Pacheco-Palencia *et. al* encontraram

cinco tipos de ácidos fenólicos na mesma espécie do fruto do açaí. Como o processo de extração do trabalho anteriormente citado não efetuou a hidrólise alcalina, pode-se considerar que o processo de hidrólise pode ter liberado os ácidos *p*-cumárico, cafeico e gálico.

O produto de açaí comumente conhecido como “açaí na tigela” é um produto industrializado muito consumido no país. Este produto é constituído pela polpa do açaí e adicionado de açúcar, banana e outros aditivos, sendo conservado congelado antes do consumo. Na fração hidrolisada foram encontrados os ácidos ferúlico, benzoico, *p*-cumárico, vanílico, cafeico e protocatecuico com teores de 0,34 a 2,78 µg g^{-1}. Em relação à polpa congelada (Tabela 3) os teores do produto de açaí foram relativamente menores para todos os ácidos encontrados. O ácido benzoico identificado na polpa e produto de açaí é um antioxidante artificial adicionado como conservante a estes alimentos, sendo encontrada em altas concentrações na fração livre e hidrolisada. A fração hidrolisada do produto de açaí demonstrou o mesmo perfil de ácidos fenólicos encontrados na polpa congelada e todas em menor concentração. Os baixos teores de ácidos fenólicos no produto de açaí se devem ao fator de diluição do produto pela adição de outros ingredientes na sua maior parte o açúcar. Poucos trabalhos reportaram o teor de ácidos fenólicos em polpa de açaí. Del Pozo-Insfran *et al.* analisaram a polpa de açaí por HPLC e encontraram os ácidos ferúlico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, protocatecuico, vanílico e *p*-cumárico em concentrações de 17,1 a 212 mg L^{-1} de polpa congelada (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004).

4. CONCLUSÕES

O processo de extração dos ácidos fenólicos é uma etapa importante para a determinação dos ácidos fenólicos por eletroforese capilar. As etapas de extração sólido-liquido seguida da extração líquido-líquido promoveram o “clean-up” e pré-concentração da amostra para possibilitar a identificação e quantificação de ácidos fenólicos dentro dos limites de quantificação do método. O estudo de recuperação dos ácidos fenólicos foi satisfatório, identificando etapas críticas de extração. Os ácidos fenólicos identificados na polpa do açaí estiveram de acordo com a literatura e este trabalho contribui com informações sobre os teores de ácidos fenólicos livre e hidrolisado em frutos produtos de açaí, evidenciando sua composição fenólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H., REZAEI, K., EMAMDJOMEH, Z., MOUSAVI, S. M. E. (2008). Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. ***Eur J Lipid Sci Tech*** 110, 435-440.

BORGES, G. D. C., VIEIRA, F. G. K., COPETTI, C., GONZAGA, L. V., ZAMBIAZI, R. C., MANCINI, J., FETT, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (Euterpe edulis) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. ***Food Res Int*** 44, 2128-2133.

COISSON, J. D., TRAVAGLIA, F., PIANA, G., CAPASSO, M., ARLORIO, M. (2005). Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. ***Food Res Int*** 38, 893-897.

DE ROSSO, V. V., HILLEBRAND, S., MONTILLA, E. C., BOBBIO, F. O., WINTERHALTER, P., MERCADANTE, A. Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (Malpighia emarginata DC.) and acai (Euterpe oleracea Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. ***J Food Compos Anal*** 21, 291-299.

DEL POZO-INSFRAN, D., BRENES, C. H., TALCOTTT, S. T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of acai (Euterpe oleracea Mart.). ***J Agr Food Chem*** 52, 1539-1545.

GALLORI, S., BILIA, A. R., BERGONZI, M. C., BARBOSA, W. L. R., VINCIERI, F. F. (2004). Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (Acai palm). ***Chromatographia*** 59, 739-743.

GAO, L., MAZZA, G. (1994). Rapid Method for Complete Chemical Characterization of Simple and Acylated Anthocyanins by High-Performance Liquid-Chromatography and Capillary Gas-Liquid-Chromatography. ***J Agr Food Chem*** 42, 118-125.

KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., HEINONEN, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. ***J Agr Food Chem*** 49, 4076-4082.

KLEJDUS, B., KOPECKY, J., BENESOVA, L., VACEK, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. ***J Chromatogr A*** 1216, 763-771.

KLEJDUS, B., VACEK, J., LOJKOVA, L., BENESOVA, L., KUBAN, V. (2008). Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. ***J Chromatogr A*** 1195, 52-59.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic-Acids .1. Extraction and Purification Procedure. ***J Agr Food Chem*** 30, 330-334.

LEA, M. A., IBEH, C., DESBORDES, C., VIZZOTTO, M., CISNEROS-ZEVALLOS, L., BYRNE, D. H., OKIE, W. R., MOYER, M. P. (2008). Inhibition of growth and induction of differentiation of colon cancer cells by peach and plum phenolic compounds. ***Anticancer Res*** 28, 2067-2076.

MENEZES, E. M. D. S., TORRES, A. T., SRUR, A. U. S. (2008). Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe olerecea* Mart) liofilizada. ***Acta Amazonica*** 38, 311-316.

MICHALKIEWICZ, A., BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. ***J Chromatogr A*** 1187, 18-24.

NACZK, M., SHAHIDI, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. ***J Pharmaceut Biomed*** 41, 1523-1542.

NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D., COMISSO, A., SCACCINI, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. ***Food Chem*** 79, 119-124.

NOVAK, I., JANEIRO, P., SERUGA, M., OLIVEIRA-BRETT, A. M. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. ***Anal Chim Acta*** 630, 107-115.

PACHECO-PALENCIA, L. A., DUNCAN, C. E., TALCOTT, S. T. (2009). Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria. ***Food Chem*** 115, 1199-1205.

PACHECO-PALENCIA, L. A., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S. T. (2008). Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from acai (Euterpe oleracea Mart.). ***J Agr Food Chem*** 56, 4631-4636.

ROBBINS, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. ***J Agr Food Chem*** 51, 2866-2887.

RODRIGUES, R. B., LICHTENTHALER, R., ZIMMERMANN, B. F., PAPAGIANNOPOULOS, M., FABRICIUS, H., MARX, F. (2006). Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. ***J Agr Food Chem*** 54, 4162-4167.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo composição e melhoramento da composição**. Belém: UFPA. 2000

SABBE, S., VERBEKE, W., DELIZA, R., MATTA, V., VAN DAMME, P. (2009). Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit

juices with different concentrations of acai (Euterpe oleracea Mart.). ***Appetite*** 53, 84-92.

SCHAUSS, A. G., WU, X. L., PRIOR, R. L., OU, B. X., PATEL, D., HUANG, D. J., KABABICK, J. P. (2006). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleraceae Mart. (Acai). ***J Agr Food Chem*** 54, 8598-8603.

SEERAM, N. P. (2008). Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. ***J Agr Food Chem*** 56, 627-629.

SEERAM, N. P., LEE, R., SCHEULLER, H. S., HEBER, D. (2006). Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. ***Food Chem*** 97, 1-11.

SHAHIDI, F., NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press. 2004. 558 p.

SKALICKA-WOZNIAK, K., GLOWNIAK, K. (2008). Quantitative Analysis of Phenolic Acids in Extracts Obtained from the Fruits of Peucedanum alsaticum L. and Peucedanum cervaria (L.) Lap. ***Chromatographia*** 68, S85-S90.

STALIKAS, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. ***J Sep Sci*** 30, 3268-3295.

SZAJDEK, A., BOROWSKA, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health - Promoting Properties of Berry Fruits: A Review ***Plant Foods Hum Nutr*** 63, 147-156.

TRUGO, L. C., MACRAE, R. (1984). Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. ***Analyst*** 109, 263-266.

WAKSMUNDZKA-HAINOS, M., ONISZCZUK, A., SZEWCZYK, K., WIANOWSKA, D. (2007). Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acids in plant materials. ***Acta Chromatogr*** 19, 227-237.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE TRIGO ENRIQUECIDA POR ELETROFORESE CAPILAR

Resumo

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, muito importante para a manutenção do organismo humano. A deficiência desta vitamina está relacionada principalmente a doenças que acometem o tubo neural do feto, isto é, malformações congênitas, que podem ser ocasionadas pela carência de ácido fólico na alimentação de gestantes. Por este motivo, programas de intervenção desta doença têm sido aplicados em vários países. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou a adição de ácido fólico às farinhas de trigo e milho na concentração de 0,15 mg/100 g de farinha. Para isto, métodos analíticos apropriados devem ser desenvolvidos para um adequado controle de qualidade e garantia da dosagem correta indicada pela legislação. Neste trabalho, com intuito de aumentar a detectabilidade do ácido fólico em farinha de trigo, métodos de pré-concentração *online* foram investigados. Um método de extração simples baseado na dissolução da farinha em solução de Na_2HPO_4 seguida de ultrassom e adição de HCl concentrado foi adotado. A focalização do ácido fólico foi obtida por CZE e MEKC, devido a fenômenos de isotacoforese transiente, sendo submetido à separação eletroforética em BGE composto de tampão borato para CZE e borato e SDS para MEKC. Entretatnto, a detecção do ácido fólico no extrato foi obtida por MEKC com injeção de grande volume de amostra em condições eletroforéticas de 40 mmol L^{-1} TBS e 30 mmol L^{-1} SDS, 15 kV a 310 nm. Os limites de detecção e de quantificação atingidos foram de 0,05 e 0,14 µg mL^{-1}, sendo adequados para quantificação do ácido fólico em farinhas de trigo.

1. INTRODUÇÃO

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, muito importante para a manutenção do organismo humano; é encontrado naturalmente em alimentos como brócolis, espinafre, couve-flor, frutas cítricas, cereais secos, grãos integrais, fermento, fígado e miúdos. Folato é o termo genérico que se refere a compostos que apresentam estruturas químicas e propriedades nutricionais similares. O ácido fólico (AF) é a forma monoglutamil totalmente oxidada desta vitamina e é comercialmente utilizada em suplementos e alimentos fortificados. A estrutura químicas do ácido fólico é ilustrada na Figura 1.

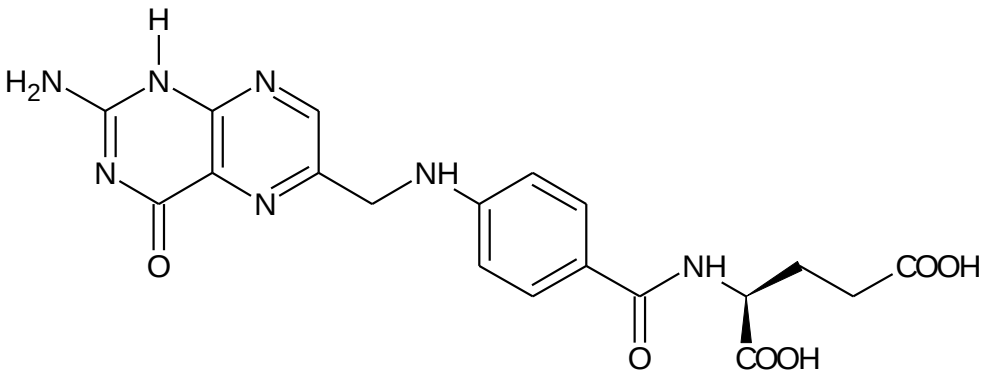


Figura 1. Estrutura química do ácido fólico.

O folato apresenta importante participação na síntese de nucleotídeos, divisão celular, expressão gênica, prevenção de alguns tipos de câncer e doenças como Alzheimer (Penteado, 2003). A deficiência desta vitamina está relacionada principalmente a doenças que acometem o tubo neural do feto, isto é, malformações congênitas, que podem ser ocasionadas pela carência de AF na alimentação de gestantes. Segundo dados do Estudo Latino-Americano Colaborativo de

Malformações Congênitas (ECLAMC), o Brasil apresentou uma alta prevalência de defeitos do tubo neural em 3,36 por mil nascidos vivos (2001). Segundo o Atlas Mundial de Defeitos Congênitos publicado pela Organização Mundial de Saúde em 2003, o Brasil é classificado como o quarto país em maior prevalência de defeitos do tubo neural (Santos e Pereira, 2007).

Por este motivo, programas de intervenção desta doença têm sido aplicados em vários países. Em 1998, a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, determinou que cereais manufaturados (farinha, arroz, pães, macarrão entre outros) fossem enriquecidos com ácido fólico na concentração de 0,14 mg/100 g de produto (FDA, 1996). A fortificação deveria ser feita com a forma sintética do folato, o ácido fólico, que é mais disponível que o folato encontrado nos alimentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou a adição de ácido fólico às farinhas de trigo e milho na concentração de 0,15 mg/100 g de farinha (ANVISA, 2002).

Alguns estudos têm indicado que, para além da prevenção de defeitos do tubo neural, o AF pode contribuir na prevenção de doenças cardiovasculares e, ainda, que pode ter um efeito protetor em relação ao câncer (Bailey *et al.*, 2003).

O enriquecimento de alimentos com AF tem abrangido uma ampla variedade de produtos. Existe uma grande preocupação em relação ao controle e informação ao consumidor sobre a quantidade estipulada nos rótulos de produtos enriquecidos. Para isto, métodos analíticos apropriados devem ser desenvolvidos para um controle de qualidade adequado e garantia da dosagem correta indicada pela legislação.

Os métodos utilizados para determinação do ácido fólico podem ser agrupados em métodos biológicos, químicos, bio-específicos (imunoenzimático e radio-imunoensaio), microbiológicos e cromatográficos, sendo que os dois últimos

são os mais utilizados (Alaburda e Shundo, 2007). O ensaio microbiológico baseia-se na medida da turbidez da solução pela ação de microrganismos específicos. Apesar deste método ser barato, pode ocorrer reação cruzada, além de ser demorado e necessitar de pessoa experiente para o manuseio da amostra e do microrganismo, garantindo a qualidade e repetibilidade dos resultados analíticos. Os métodos cromatográficos, principalmente HPLC, permitem a separação das diferentes formas de folatos e sua quantificação. Os métodos cromatográficos podem ser altamente específicos, confiáveis e requerem menos tempo do que os ensaios microbiológicos, porém são mais caros e apresentam menor detectabilidade (Arcot e Shrestha, 2005).

A cromatografia líquida em fase reversa tem sido a técnica analítica mais utilizada para a determinação de AF em diferentes alimentos, como cereais (Osseyi *et al.*, 1998; Poo-Prieto *et al.*, 2006), farinha de trigo, pães, macarrão (Alaburda *et al.*, 2008; Gujska *et al.*, 2009) e leite enriquecido (Catharino *et al.*, 2003). Os modos de detecção mais utilizados são UV-Vis ou MS, uma vez que o ácido fólico não apresenta fluorescência natural.

A eletroforese capilar é uma técnica de separação que tem sido cada vez mais utilizada devido as suas vantagens como alta eficiência de separação, análises rápidas e baixo consumo de solventes. Os diferentes modos de eletroforese capilar permitem a determinação de diferentes espécies químicas em diferentes matrizes. A determinação do ácido fólico por eletroforese capilar de zona (CZE) (Zhao *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Uysal *et al.*, 2010), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) (Gomis *et al.*, 1999) e cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) (Buskov *et al.*, 1998; Aurora-Prado *et al.*, 2004) foi relatada. A maior parte dos trabalhos é aplicada a formulações

farmacêuticas e a determinação de AF em alimentos é pouco demonstrada devido à sua baixa detectabilidade em matrizes complexas. Cheung *et al.* (2009) investigaram a estabilidade do ácido fólico adicionado em formulações de macarrão instantâneo por CZE; o teor de ácido fólico adicionado à farinha foi de 0,05 g por 100 g de farinha e o limite de detecção do método foi de 2,2 mg L^{-1}. Entretanto, o método citado não atingiu o limite de quantificação necessário para a quantificação do ácido fólico em farinhas de trigo enriquecidas. A determinação de ácido fólico em diferentes variedades de lentilhas foi realizada por Uysal *et al*. (2010). O ácido fólico foi detectado a 200 nm em sistema eletroforético composto de 10 mM de borato de sódio, 10 % metanol, pH 9, +18 kV. O limite de detecção do método foi de 0,27 µg mL^{-1}. O processo de extração foi relativamente simples, entretanto o tempo de análise de 22 minutos foi demasiadamente longo (Uysal *et al.*, 2010).

A baixa detectabilidade em CE, devido ao pequeno volume de amostra injetado e reduzido caminho ótico do capilar (50 e 75 µm d.i.), tem sido uma limitação para análise de compostos em baixas concentrações em alimentos e que absorvem no UV. Uma das principais estratégias utilizadas em CE para compensar esta limitação é o desenvolvimento da pré-concentração *online*. Nesta modalidade, é possível inserir um grande volume de amostra na coluna capilar e concentrar os analitos, com grande eficiência, através de diferentes estratégias conhecidas como *stacking* (Urbanek et al., 2003). Estas estratégias são baseadas em fenômenos físico-químicos e envolvem a manipulação da composição da amostra (através da manipulação da velocidade eletroforética do analito) e do tampão ou eletrólito de corrida, juntamente com procedimentos de injeção simples, sem necessidade de alterar a instrumentação presente (de Moraes *et al.*, 2009). As diferentes estratégias de pré-concentração *online* incluem: *stacking* mediado por força iônica, amplificação

por campo elétrico, injeção de grande volume de amostra, *stacking* mediado por pH, isotacoforese transiente e *sweeping* (Osbourn *et al.*, 2000; Quirino *et al.*, 2000).

Existe uma grande preocupação em relação ao controle de qualidade e informação ao consumidor sobre a quantidade estipulada nos rótulos de produtos enriquecidos. Para isto, métodos analíticos apropriados devem ser desenvolvidos para um adequado controle de qualidade e garantia da dosagem correta indicada pela legislação. Neste trabalho, um método de pré-concentração on-line é proposto para a determinação de baixos níveis de acido fólico adicionado em farinha de trigo.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água deionizada purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). O padrão de ácido fólico obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.), foi dissolvido em solução aquosa de Na_2HPO_4 0,1 mol L^{-1} na concentração de 1000 µg mL^{-1}, perfazendo a solução estoque e armazenado sob refrigeração.

Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente pela diluição de soluções estoques de 100 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio (TBS), 100 mmol L^{-1} de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 100 mmol L^{-1} de hidrogenofosfato de sódio e obtidos da Merck (Darmstadt – Alemanha).

2.2 Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar modelo HP^{3D} CE (Agilent, USA) com detector de arranjo de diodos (DAD) e uso do software HP Chemstation para aquisição e tratamento de dados. As injeções das amostras foram realizadas hidrodinamicamente, sendo as condições especificadas em cada eletroferograma. O sistema eletroforético foi operado com polaridade normal e condições de tensão especificadas nos eletroferogramas.

Os capilares utilizados nos experimentos eram constituídos de sílica fundida, revestidos externamente com poli-imida, com 75 µm de diâmetro interno, comprimento total de 48 cm e o comprimento efetivo de 39,5 cm. A temperatura do capilar foi controlada por sistema de refrigeração e mantida a 25º C. O condicionamento inicial do capilar foi efetuado através de lavagem com solução de

hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (950 mbar/30 min) e água deionizada (950 mbar/30 min). O condicionamento do capilar no início de cada dia foi feito através de lavagem com NaOH 1 mol L^{-1} (950 mbar/10 min), água (950 mbar/5 min). No final do dia o capilar foi lavado com NaOH 1 mol L^{-1} (950 mbar/5 min) e água (950 mbar/5 min). No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com soluções do eletrólito de corrida (950 mbar/3 min).

2.3. Preparo de amostras

Amostras de farinha de trigo foram adquiridas de mercado local e armazenadas sob refrigeração. Uma amostra de farinha isenta de ácido fólico foi obtida por doação da indústria Bunge Alimentos S.A.. Diferentes métodos de extração foram testados para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo enriquecidas:

Método 1 – Método adaptado de Catharino e Godoy (2001). Dois gramas de farinha de trigo foram homogeneizados em 5 mL de solução de KOH 10 mmol L^{-1} e submetidos a ultrassom por 10 min. A seguir foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) concentrado e 4,9 µL de Na_2HPO_4 0,1 mol L^{-1}. A mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi recolhido para injeção no sistema de eletroforese capilar.

Método 2 – Inicialmente, 2 g de farinha de trigo foram homogeneizados em 5 mL de solução de Na_2HPO_4 40 mmol L^{-1} (pH 8,4) e submetido a ultrassom por 10 min. A este extrato foram adicionados 10 µL de ácido clorídrico concentrado e 4,99 mL de água deionizada. Esta solução foi homogeneizada e centrifugada a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para posterior injeção em sistema de eletroforese capilar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foi investigada a determinação do ácido fólico por CZE, uma vez que este composto pode ser encontrado na forma ionizada em pH acima de 2,4. De acordo com Szakács e Noszai, os pK_as do ácido fólico calculados foram de 2,4, 3,5, 5,0 e 8,1 (Szakacs e Noszai, 2006). O ácido fólico apresenta maior estabilidade em meio alcalino do que em meio ácido, sendo mais solúvel em solução aquosa alcalina, pouco solúvel em água, em meio neutro e insolúvel em solventes orgânicos como, etanol, acetona e éter (Alaburda e Shundo, 2007). Devido sua maior estabilidade e solubilidade em meio alcalino, tampões fosfato e borato em pH elevado foram empregados.

Inicialmente, com intuito de estudar a composição de eletrólito, uma solução padrão de ácido fólico diluído em água (injeção normal 50 mbar por 5 s) foi testada em diferentes concentrações (5 – 50 mmol L^{-1}) de tampão fosfato e borato. Melhores resultados de simetria de pico foram obtidos quando se utilizou tetraborato de sódio pH 9,2. Avaliando-se diferentes composições do meio de dissolução da amostra injetada, foi verificado um aumento no sinal do pico de ácido fólico quando este foi dissolvido em solução de fosfato e injetado em capilar contendo tampão TBS pH 9,2, após aplicação de tensão de +15kV.

Assim, para estudos de pré-concentração *online*, a injeção de grande volume de amostra em diferentes meios foi testada, como demonstrado na Figura 2. A dissolução do ácido fólico em água e borato (Fig. 2 A e B respectivamente) promoveram a formação de bandas largas. Entretanto, a dissolução do ácido fólico em alta concentração de fosfato (Fig. 2 C) promoveu a focalização *online* com um grande aumento de sinal em relação às demais amostras.

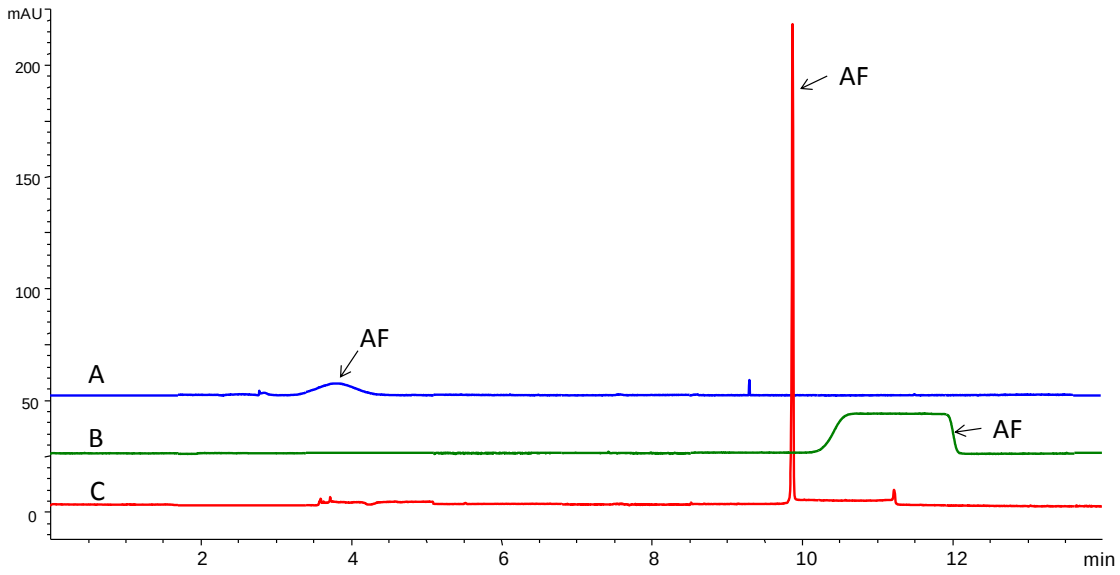


Figura 2. Eletroferogramas do estudo da injeção de grande volume de solução padrão (50 mbar/30 s) de ácido fólico (5 µg mL^{-1}) dissolvido em: água (A), 30 mmol L^{-1} de TBS (B) e 0,1 mol L^{-1} de Na_2HPO_4 (C). Condições eletroforéticas: eletrólito composto de 30 mmol L^{-1} de TBS; tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 214 nm.

A acumulação de ácido fólico em um pico muito fino, como observado na Figura 2 C, foi atribuído a um fenômeno de pré-concentração por isotacoforese transiente, pormovido pelos componentes da amostra.

A isotacoforese transiente (tITP) é um método de pré-concentração que combina os modos de isotacoforese (ITP) e a eletroforese capilar em zona (CZE) em um único capilar. Em ITP, os analitos são separados em bandas sucessivas adjacentes, de acordo com sua mobilidade eletroforética. Um analito forma uma banda centralizada entre duas outras, uma com mobilidade superior e outra com mobilidade inferior (de Moraes *et al.*, 2009). A separação destas bandas envolve a seleção da composição adequada de eletrólitos, que podem atuar como concentradores do analito de interesse. De acordo com a mobilidade dos íons (µ) do sistema, o co-íon do eletrólito de corrida pode atuar como terminador e um macro componente (M) presente no *plug* da amostra contendo o analito (A) pode atuar

como uma banda líder se |μM| > |μA| > |μco-íon|, ou vice versa se |μco-íon|> |μA| > |μM| (Urbanek *et al.*, 2003).

A Figura 3 ilustra o esquema de uma pré-concentração *online* por tITP para dois analitos A_1 e A_2 quando |μM| > |μA_2| > |μA_1| > |μco-íon|. Quando a tensão é aplicada, a ITP se inicia e as concentrações de eletrólito líder e terminador vão se adequando, a fim de proporcionar a focalização das bandas (Fig. 3 B). O macro componente no sistema é acelerado em relação a A_1 e A_2, devido a sua maior velocidade de migração. A fronteira entre M e BGE é frontal e se difunde (Fig. 3 C). Posteriormente, todos os componentes migram no modo CZE (Fig. 3 D).

No caso da pré-concentração do ácido fólico demonstrada na Figura 2 C, é possível visualizar a formação de uma banda posterior ao pico concentrado de ácido fólico. A formação desta banda ocorre devido à focalização do íon fosfato (Fos) presente no plug de amostra, que é o macro componente responsável pela focalização do ácido fólico por isotacoforese transiente. Em pH 9,2, |μFos| > |μAF| > |μBor|. Assim, devido à presença do fluxo eletrosmótico, a ordem de migração dos ânions é invertida sendo primeiramente detectado o pico de ácido fólico e em seguida a banda de fosfato.

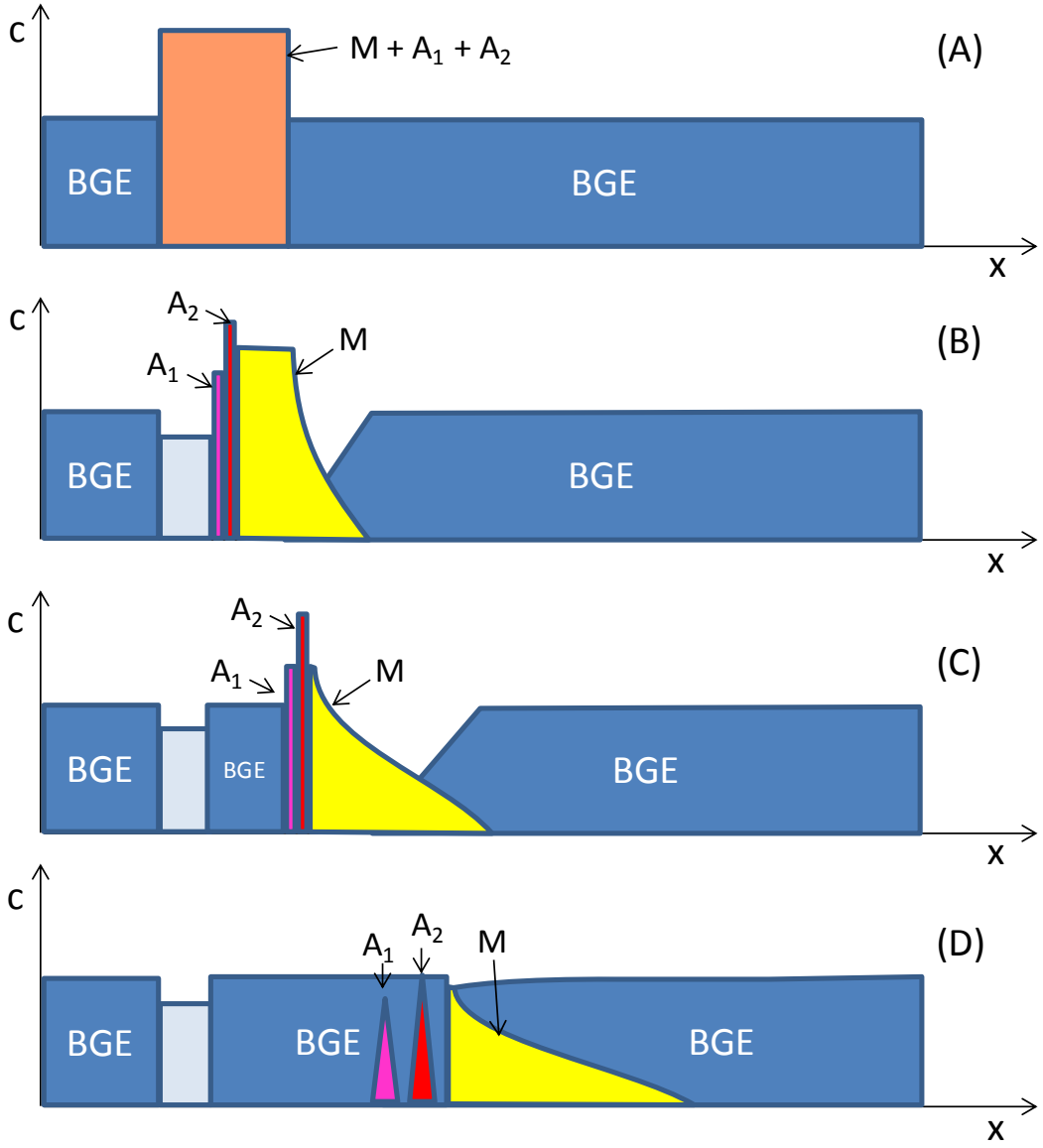


Figura 3. Esquema da pré-concentração *online* por isotacoforese transiente induzido pela composição da amostra. A1 e A2 são diferentes analitos, M é um macro componente presente no plug de amostra, BGE é o eletrólito de corrida, c é a concentração e x o caminho de migração. (Adapatado de Urbanek *et al*., 2003)

Uma explicação alternativa para o fenômeno observado de pré-concentração *online* é a junção dinâmica de pH. Esta técnica é baseada na junção de diferentes tampões para gerar um gradiente de pH transiente entre o plug de amostra e o eletrólito de corrida sob a aplicação de tensão. Por esta estratégia é possível focalizar e separar analitos fracamente iônicos em uma única etapa, onde o analito pode ser dissolvido em um tampão diferente do eletrólito de corrida. A junção

dinâmica de pH é formada na interface entre a amostra (contendo o analito) e a zona do BGE. A amostra consiste do mesmo sistema do BGE ou pode-se usar diferentes tipos de eletrólitos como BGE para otimizar a faixa de junção de pH para a focalização dos analitos fracamente ácidos, básicos ou zwiterionicos baseados em seu pK_a (Britz-McKibbin e Terabe, 2003). A concentração *online* do ácido fólico por junção dinâmica de pH foi relatada no trabalho de Du *et al*.. Os autores utilizaram como sistema eletroforético tampão borato 160 mmol L^{-1} (pH 9,2) e injeção de grande volume de amostra (0,5 psi x 20 s) contendo tampão fosfato 75 mmol L^{-1} (pH 6,0) (Du *et al.*, 2007). As condições utilizadas no presente trabalho foram semelhantes ao trabalho citado. Entretanto, a diferença de pH observada entre o plug da amostra e o BGE foi menor; o AF foi dissolvido em solução de Na_2HPO_4 (0,1 mol L^{-1}) com pH 8,4 enquanto o BGE apresentou pH 9,2. Devido ao fato do último pKa do ácido fólico ser de 8,1, a transição de pH de 8,5 a 9,2 é muito restrita para explicar a focalização do AF por junção dinâmica de pH.

Para o desenvolvimento do método para determinação de ácido fólico por CZE, diferentes condições de composição de eletrólitos e condições eletroforéticas foram avaliadas, juntamente com diferentes condições de extração, uma vez que é necessário separar o pico de ácido fólico dos interferentes presentes na matriz de farinha de trigo.

Utilizando-se eletrólitos de tetraborato de sódio nas concentrações de 10 a 40 mmol L^{-1} os formatos de pico do ácido fólico foram simétricos com tempos de migração de até 12 minutos. Concentrações superiores a 50 mmol L^{-1} de TBS não foram utilizados por aumentar o tempo de migração do ácido fólico e aumentar a corrente do sistema eletroforético (acima de 100 µA). Sistemas com corrente acima

de 100 µA devem ser evitados por promover o aquecimento devido ao efeito Joule e comprometer a repetibilidade da separação.

Diferentes métodos de extração foram estudados para a detecção do ácido fólico em matrizes de farinha de trigo. Os diferentes extratos de farinha de trigo obtidos pelos métodos 1 e 2, descritos anteriormente na parte experimental, foram testados em diferentes concentrações de eletrólito. O ácido fólico não foi identificado em nenhuma das condições avaliadas, mesmo variando-se a tensão do sistema entre 10 a 30 kV e avaliando os diferentes comprimentos de onda de absorção (214, 250 e 280 nm). Foi observada a interferência da matriz no tempo de migração do ácido fólico como demonstrado nos eletroferogramas apresentados na Figura 4. A condição de extração utilizada no extrato demonstrado na Figura 4 foi efetuada de acordo com o método 1.

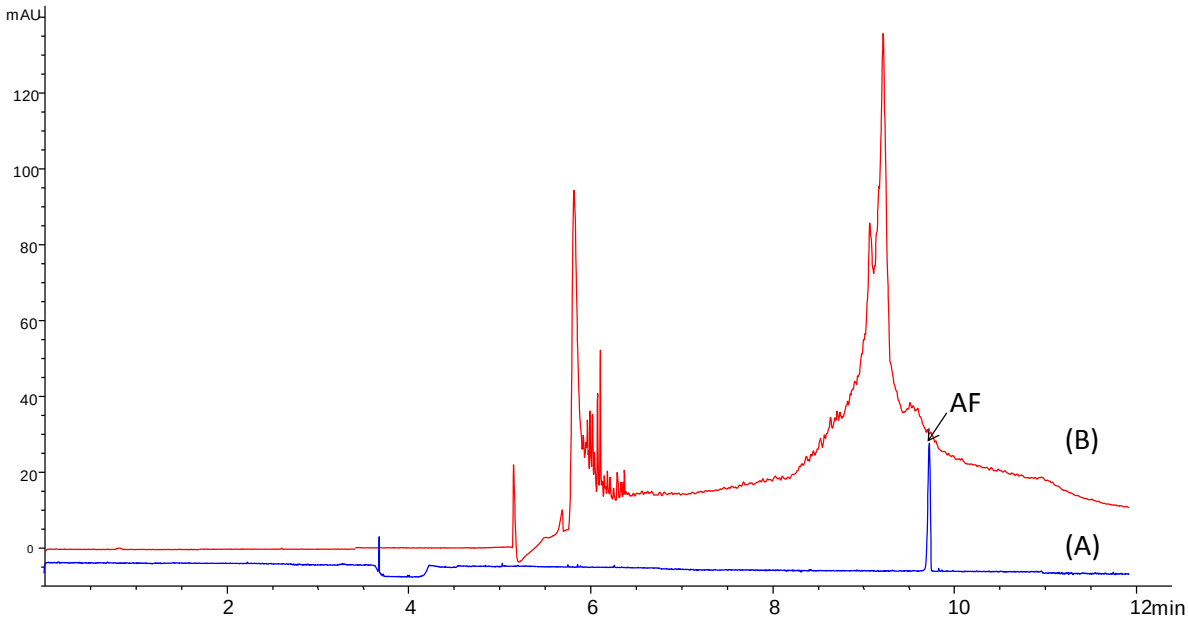


Figura 4. Eletroferogramas do padrão de ácido fólico na concentração de 0,5 µg mL^{-1} dissolvido em solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1} (A) e do extrato de farinha de trigo (método 1) fortificado com 0,5 µg mL^{-1} (B). Condições eletroforéticas: eletrólito composto de 30 mmol L^{-1} de TBS capilar de 75 µm d.i., 48,5 cm comp. total e 40 cm comp. efetivo, tensão de +18 kV, 25º C, injeção de 50 mbar por 5 s, 280 nm.

Com intuito de minimizar o efeito da matriz e promover um aumento de seletividade, a adição de dodecilsulfato de sódio (SDS) ao eletrólito de separação foi investigada. Diferentes concentrações de borato e de SDS foram estudadas, avaliando-se o fenômeno de pré-concentração *online* do ácido fólico e posteriormente o perfil dos extratos de farinha de trigo.

O efeito do tampão borato foi avaliado mantendo-se a concentração de SDS em 50 mmol L^{-1} e variando-se a concentração de TBS de 10 a 50 mmol L^{-1}. Como ilustrado na Figura 5, foi observado um pico de ácido fólico extremamente fino quando utilizado 10 mmol L^{-1} de TBS, enquanto que picos de menor intensidade e na forma de gaussiana foram observados em concentrações de 30 e 50 mmol L^{-1} de TBS. Também foi observado um desnível na linha de base após o pico de ácido fólico possivelmente devido à formação de um *plug* de íons fosfato provenientes da composição do *plug* de amostra, uma vez que o AF foi dissolvido em solução contendo Na_2HPO_4 em alta concentração para reproduzir a amostra real. Este fenômeno indica a formação da pré-concentração online por tITP como descrito anteriormente. Na Figura 5 A pode-se observar que o ácido fólico se encontra focalizado na fronteira entre o *plug* de fosfato com o BGE. De acordo com Quirino *et al.* (2000), as micelas também se concentram na fronteira entre o *plug* de fosfato e o eletrólito de TBS, contribuindo para a focalização do ácido fólico e a formação de um pico extremamente fino e de grande intensidade. O aumento da concentração de TBS proporcionou a desfocalização do pico de ácido fólico e sua migração no eletrólito por MEKC. A desfocalização do pico de ácido fólico é importante para sua separação do sinal que marca a fronteira entre o eletrólito e o *plug* de fosfato. Sendo este um interferente para detecções de baixas concentrações de ácido fólico. Mantendo-se a concentração de TBS em 30 mmol L^{-1} a variação da concentração de

SDS de 10 a 70 mmol L^{-1} não promoveram grandes alterações de mobilidade no pico de ácido fólico (Figura 6).

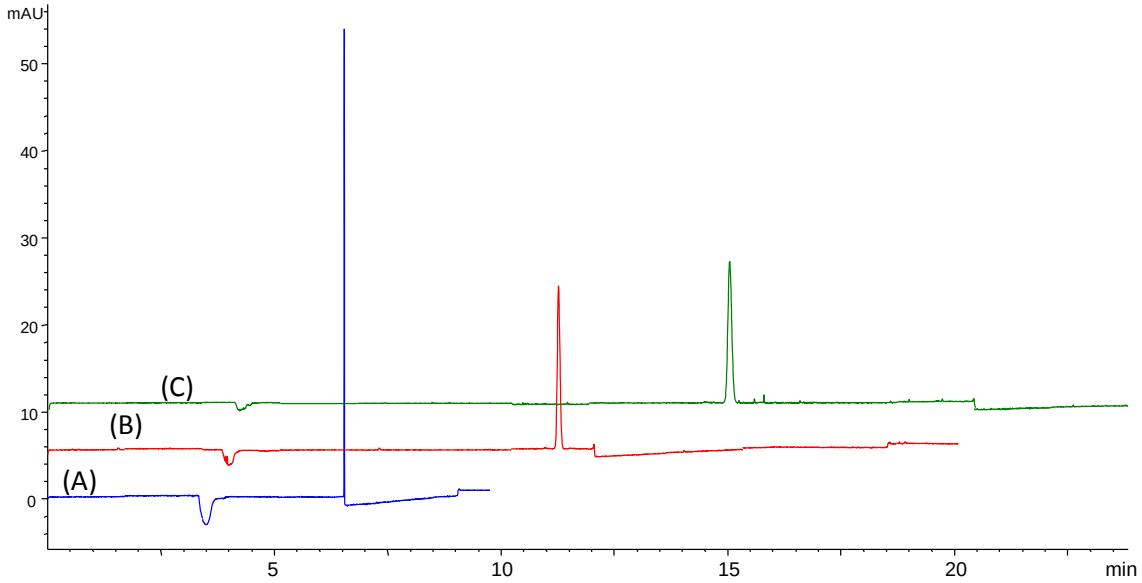


Figura 5. Eletroferogramas do padrão de ácido fólico na concentração de 5 µg mL^{-1} dissolvido em solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito composto de 50 mmol L^{-1} SDS e 10 mmol L^{-1} de TBS (A), 30 mmol L^{-1} de TBS (B) e 50 mmol L^{-1} de TBS (C); injeção de 50 mbar por 10 s; tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 280 nm.

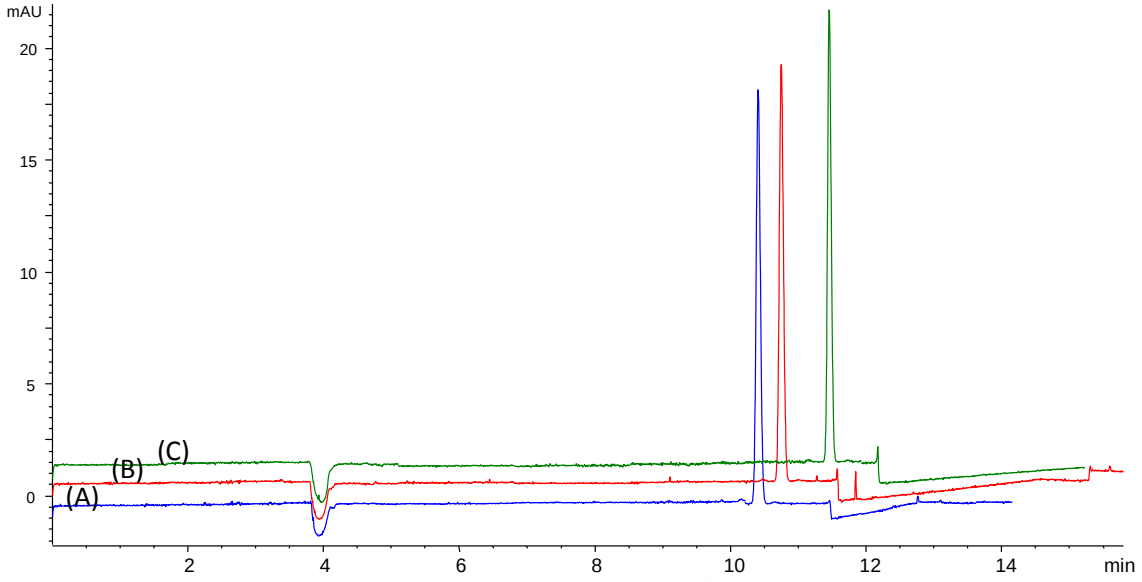


Figura 6. Eletroferogramas do padrão de ácido fólico na concentração de 5 µg mL^{-1} dissolvido solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1}. Condições eletroforéticas: Eletrólito composto de 30 mmol L^{-1} de TBS e 10 mmol L^{-1} de SDS (A), 30 mmol L^{-1} de SDS (B) e 70 mmol L^{-1} de SDS (C); injeção de 50 mbar por 10 s; tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 280 nm.

Em seguida, com objetivo de aumentar o efeito de pré-concentração, o tempo de injeção da amostra foi aumentado para 20 e 30 s. Baseado nos resultados anteriores utilizando-se 30 mmol L^{-1} TBS e 50 mmol L^{-1} de SDS, o aumento do tempo de injeção de 10 s para 20 s (Fig. 7 A) promoveu a focalização do ácido fólico na fronteira do *plug* de fosfato, devido ao aumento da largura deste *plug,*o que prejudicaria a determinação do AF. A desfocalização deste analito foi obtida com o aumento da concentração de TBS e SDS. Assim, foi possível separar o pico de ácido fólico da fronteira do plug de fosfato com tempos de injeção de 20 e 30 s com eletrólito composto de 50 mmol L^{-1} de TBS e 50 mmol L^{-1} de SDS (Fig. 7 B e 7 C). Para diminuir o tempo de migração do ácido fólico e a corrente do sistema, a composição ótima de eletrólito foi de 40 mmol L^{-1} de TBS e 30 mmol L^{-1} SDS com injeção de 50 mbar por 30 s (Fig. 7 D).

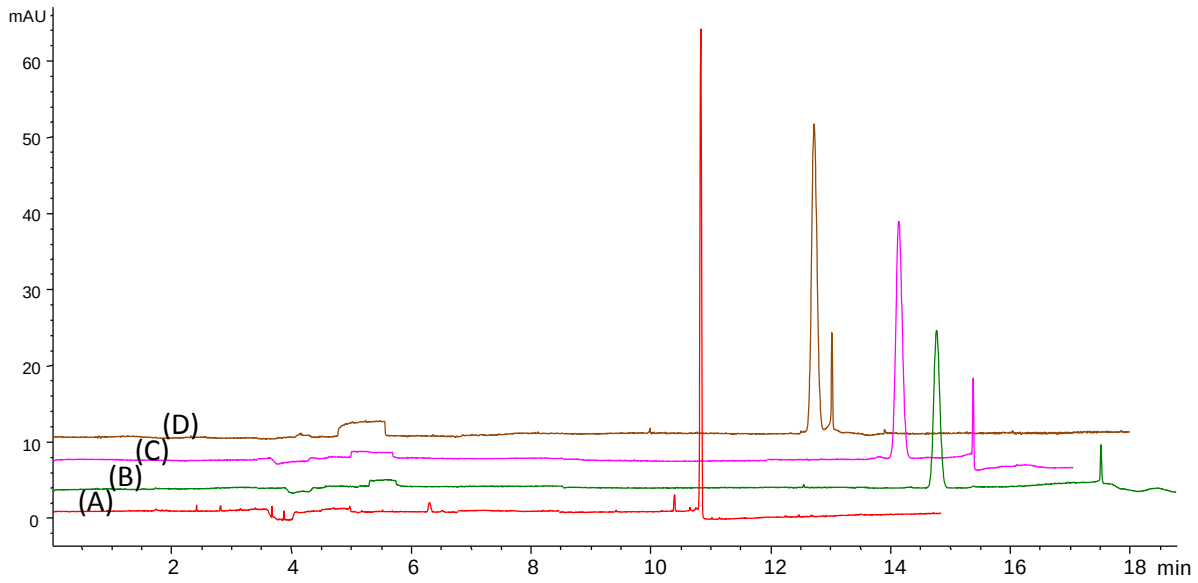


Figura 7. Eletroferogramas do padrão de ácido fólico na concentração de 5 µg mL^{-1} dissolvido em solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1}. Condições eletroforéticas: Eletrólito composto de 30 mmol L^{-1} TBS e 50 mmol L^{-1} de SDS com injeção de 50 mbar/20 s (A), 50 mmol L^{-1} de TBS e 50 mmol L^{-1} SDS com injeção de 50 mbar/ 20 s, (B) 50 mmol L^{-1} de TBS e 50 mmol L^{-1} SDS com injeção de 50 mbar/ 30 s (C), 40 mmol L^{-1} TBS e 30 mmol L^{-1} de SDS com injeção de 50 mbar/30 s (D); tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 214 nm.

A Figura 8 demonstra o ganho de eficiência com a injeção de grande volume de amostra de ácido fólico quando dissolvido em solução Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1} em relação a outros meios. Quando dissolvido em solução borato ou eletrólito composto de 40 mmol L^{-1} de TBS e 30 mmol L^{-1} de SDS o ácido fólico é detectado na forma de uma banda larga, evidenciando que não há mudança na mobilidade no plug de amostra (Fig. 8 B e C). A injeção da amostra de padrão dissolvido em água apresentou um pico gaussiano, entretanto, de baixa intensidade e mais disperso. O aumento de sinal obtido foi cerca de 5,6 vezes maior quando o ácido fólico foi dissolvido em solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1} (Fig. 8 A) em relação ao sinal obtido quando dissolvido em água (Fig. 8 D).

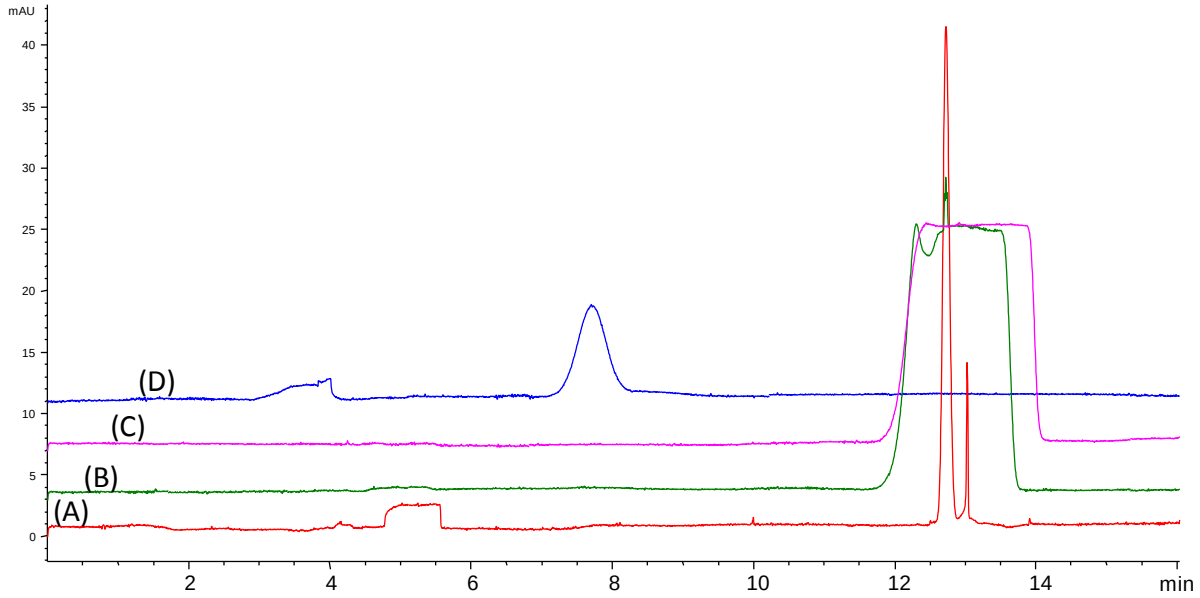


Figura 8. Eletroferogramas do padrão de ácido fólico na concentração de 5 µg mL^{-1} dissolvido em diferentes meios: solução de Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1} (A); eletrólito de 40 mmol L^{-1} de TBS e 30 mmol L^{-1} SDS (B); solução TBS 30 mmol L^{-1} (C) e água (D). Condições eletroforéticas: Eletrólito composto de 40 mmol L^{-1} de TBS e 30 mmol L^{-1} SDS; injeção de amostra de 50 mbar por 30 s; tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 214 nm.

Para estudos de extração, diferentes métodos foram investigados. Para cada extrato injetado no sistema de eletroforese capilar, testes de adição de padrão de ácido fólico no extrato obtido foram efetuados, para identificar o pico do analito e verificar seu comportamento na matriz da amostra. Inicialmente, o método proposto por Catharino e Godoy (2001) (Método 1) foi aplicado para avaliar a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo. Este método foi desenvolvido para extração do AF em amostras de leite com KOH sob ultrassom, seguida da adição de ácido tricloroacético (TCA) e tampão fosfato (pH 6,5) e posterior filtração em membrana Durapore 0,45 µm. Neste trabalho, para extração de AF em amostras de farinha, o método foi adaptado com a utilização da centrifugação para separar o material sólido. Este método mostrou-se eficiente para a clarificação do extrato pela adição de TCA, por promover a precipitação de proteínas. O perfil eletroforético do extrato apresentou menor interferência de matriz. Contudo, foi verificado um pico interferente no mesmo tempo de migração do ácido fólico pela comparação de um extrato de farinha “branco” (isenta de ácido fólico). Baseado neste resultado, outros parâmetros das condições de extração foram alterados, para obtenção de condições ideais para detecção do ácido fólico. Assim, o método proposto (Método 2) permitiu a detecção e pré-concentração do ácido fólico pela diminuição da concentração de fosfato no extrato e pela utilização de ácido clorídrico para purificação da amostra, em vez do TCA. Os eletroferogramas da Figura 9 demonstram o perfil de extrato de farinha de trigo isenta de ácido fólico (Fig. 9 A) e fortificada com 0,25 µg mL^{-1} (Fig. 9 B). A detecção do ácido fólico foi efetuada em 310 nm, para eliminar interferentes detectados em 214 e 280 nm. Apesar da hidrólise enzimática ser empregada na maioria dos trabalhos da literatura que trabalham amostras contendo folatos, a hidrólise não é necessária para a investigação do ácido fólico em produtos

enriquecidos, por este ser encontrado na forma monoglutâmica livre. Muitas vezes, como resultado da hidrólise da matriz, há a liberação de outros compostos que podem interferir na análise, dificultando a detecção e quantificação do método (Catharino *et al.*, 2003).

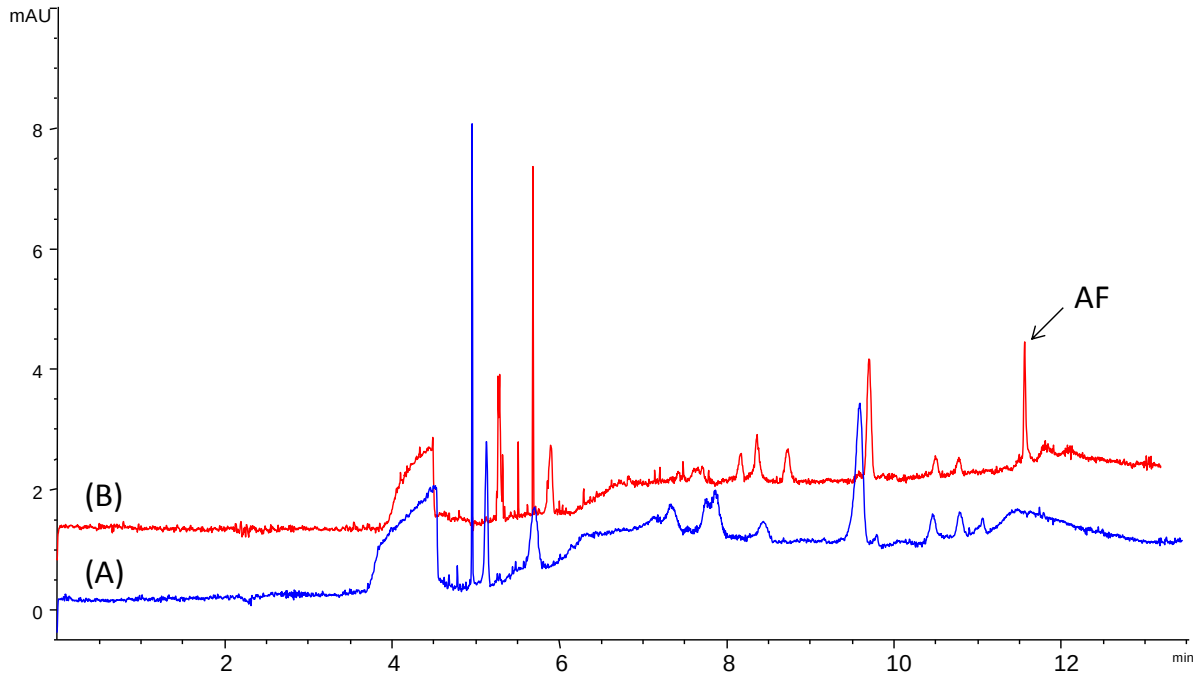


Figura 9. Eletroferogramas de amostras de farinha de trigo isenta de ácido fólico (A) e fortificada com ácido fólico na concentração de 0,25 µg mL^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito composto de 40 mmol L^{-1} de TBS e 30 mmol L^{-1} SDS; injeção de amostra de 50 mbar por 30 s; tensão aplicada de +15 kV; detecção direta a 310 nm.

Para avaliar a linearidade, curvas analíticas na faixa de 0,25 a 1,25 µg mL^{-1} foram construídas e os resultados encontram-se na Figura 10 e Tabela 1. As soluções padrão foram preparadas em solução de Na_2HPO_4 20 mmol L^{-1}. Os limites de detecção e de quantificação foram baseados nos dados da curva analítica. O limite de detecção foi calculado pela relação de 3,3 vezes o valor do desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação da reta. Enquanto que o limite de quantificação foi de 10 vezes a razão entre o desvio padrão do intercepto e a inclinação da reta .

Os limites de detecção e de quantificação atingidos foram de 0,047 e de 0,14 µg mL^{-1}, respectivamente. Para a quantificação do ácido fólico em farinha de trigo enriquecida é necessário atingir baixos limites de detecção para a quantificação do teor estipulado por lei de 150 µg por 100 g de farinha de trigo (ANVISA, 2002). De acordo com o limite de quantificação atingido por pré-concentração online, foi estimada a possibilidade de detecção de 23,5 µg por 100 g de amostra de farinha e quantificação de 70 µg por 100 g de amostra de farinha.

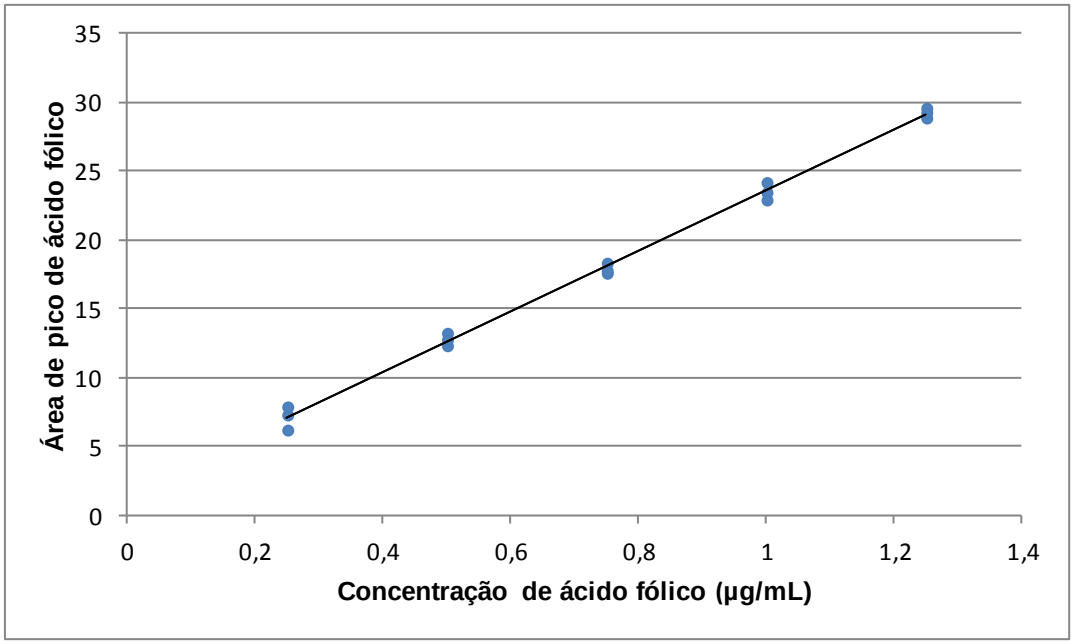


Figura 10. Curva de analítica de soluções de padrão de ácido fólico em concentrações de 0,25 a 1,25 µg mL^{-1} em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros de linearidade, limite de detecção e de quantificação do método.

Parâmetros avaliados	**Resultados**
Faixa de trabalho	0,25 a 1,25 µg mL^{-1}
Intercepto	1,64 ± 0,31
Inclinação	22,0 ± 0,38
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9961
Erro padrão da regressão	0,52
F	3337
p	$4,62x10^{-17}$
Limite de detecção (µg mL^{-1})	0,047
Limite de quantificação (µg mL^{-1})	0,14

A precisão instrumental do método foi caracterizada pela injeção de seis amostras de soluções padrão em três níveis de concentração avaliando as repetibilidades intradia. Os resultados são demonstrados na Tabela 2. Os resultados de repetibilidade para área de pico foram de 1,0 a 8,3%, sendo o maior valor de variação observado para a menor concentração de ácido fólico. O tempo de migração apresentou pouca variação dos dados com coeficientes de variação de 0,39 a 1,7%.

Tabela 2. Resultados de precisão intradia.

Concentração da amostra (µg mL^{-1})	**Área de pico % C.V. (n=6)**	**Tempo de migração % C.V. (n=6)**
0,25	8,3	0,39
0,75	2,3	1,7
1,25	1,0	1,7

Apesar dos bons resultados demonstrados com estudos efetuados com soluções de padrão de ácido fólico em solução aquosa contendo fosfato, os dados de repetibilidade efetuados com amostras reais de farinha de trigo não foram satisfatórios quanto aos parâmetros de validação. Esta variação nos valores de área de pico ocorrem devido a interferência da composição da matriz. Devido à injeção de grande volume de amostra, pequenas diferenças de viscosidade da matriz da amostra podem afetar na reprodutibilidade dos dados. Uma maneira de corrigir este problema é a utilização de um padrão interno adequado ao sistema eletroforético utilizado. O aumento do tempo de injeção da amostra também é proposto para se aumentar o sinal do pico de ácido fólico, e assim diminuir o erro. A validação completa utilizando uma amostra de referência que seria a farinha de trigo isenta de ácido fólico também é proposta.

4. Conclusões

A pré-concentração online do ácido fólico foi obtida por um método simples, com composição de eletrólito de 40 mmol L^{-1} TBS e 30 mmol L^{-1} SDS, com injeção de grande volume de amostra contendo tampão fosfato. A focalização do ácido fólico ocorreu devido a fenômenos promovidos pela focalização por isotacoforese transiente em meio micelar. O aumento de sinal obtido foi cerca de 5,6 vezes maior quando o ácido fólico foi dissolvido em tampão fosfato em relação à injeção da amostra dissolvida em água.

O método desenvolvido foi linear para concentrações de 0,25 a 1,25 µg mL^{-1} atingindo um baixo limite de quantificação de 0,14 µg mL^{-1}, que corresponde a 0,7 µg g^{-1} de amostra de farinha de trigo, o que está de acordo com a exigência da legislação.

O método de extração utilizado foi simples e permitiu a detecção do ácido fólico em matrizes de farinha de trigo fortificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABURDA, J., DE ALMELDA, A. P., SHUNDO, L., RUVIERI, V., SABINO, M. (2008). Determination of folic acid in fortified wheat flours. ***J Food Compos Anal*** 21, 336-342.

ALABURDA, J., SHUNDO, L. (2007). Ácido fólico e fortificação de alimentos. ***Rev. Inst. Adolfo Lutz*** 66, 95-102.

ANVISA, 2002. Resolução RDC n° 344, de 13 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

ARCOT, J., SHRESTHA, A. (2005). Folate: methods of analysis. ***Trends Food Sci Tech*** 16, 253-266.

AURORA-PRADO, M. S., SILVA, C. A., TAVARES, M. E., ALTRIA, K. D. (2004). Determination of folic acid in tablets by microemulsion electrokinetic chromatography. ***J Chromatogr A*** 1051, 291-296.

BAILEY, L. B., RAMPERSAUD, G. C., KAUWELL, G. P. A. (2003). Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: Evolving science. ***J Nutr*** 133, 1961s-1968s.

BRITZ-MCKIBBIN, P., TERABE, S. (2003). On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis. ***J Chromatogr A*** 1000, 917-934.

BUSKOV, S., MOLLER, P., SORENSEN, H., SORENSEN, J. C., SORENSEN, S. (1998). Determination of vitamins in food based on supercritical fluid extraction prior to micellar electrokinetic capillary chromatographic analyses of individual vitamins. ***J Chromatogr A*** 802, 233-241.

CATHARINO, R. R., VISENTAINER, J. V., GODOY, H. T. (2003). Avaliação das Condições Experimentais de CLAE na Determinação de àcido Fólico em Leites Enriquecidos. ***Ciênc. Tecnol. Aliment.*** 23, 389-395.

CHEUNG, R. H. F., MORRISON, P. D., SMALL, D. M., MARRIOTT, P. J. (2008). Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography. ***J Chromatogr A*** 1213, 93-99.

DE MORAES, M. D. L., DE MORAES, S. L., PEREIRA, E. A., TAVARES, M. F. M. (2009). Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. ***Quim. Nova*** 32, 1041-1046.

DU, Y. Y., JIA, L., LIU, H. Q., XING, D. (2007). Comparison of on-line concentration methods in capillary zone electrophoresis for analysis of water-soluble vitamins. ***Anal Lett*** 40, 2005-2015.

FDA, F. A. D. A., 1996. Food Standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid Federal Register, vol. 61, pp. 8781-8797.

GOMIS, D. B., GONZALEZ, L. L., ALVAREZ, D. G. (1999). Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins. ***Anal Chim Acta*** 396, 55-60.

GUJSKA, E., MICHALAK, J., KLEPACKA, J. (2009). Folates Stability in Two Types of Rye Breads During Processing and Frozen Storage. ***Plant Food Hum Nutr*** 64, 129-134.

LIU, O. Q., LIU, Y. L., GUAN, Y., JIA, L. (2009). Comparison of field-enhanced and pressure-assisted field-enhanced sample injection techniques for the analysis of water-soluble vitamins using CZE. ***J Sep Sci*** 32, 1011-1017.

OSBOURN, D. M., WEISS, D. J., LUNTE, C. E. (2000). On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. ***Electrophoresis*** 21, 2768-2779.

OSSEYI, E. S., WEHLING, R. L., ALBRECHT, J. A. (1998). Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. ***J Chromatogr A*** 826, 235-240.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole. 2003

POO-PRIETO, R., HAYTOWITZ, D. B., HOLDEN, J. M., ROGERS, G., CHOUMENKOVITCH, S. F., JACQUES, P. F., SELHUB, J. (2006). Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. ***J Nutr*** 136, 3079-3083.

QUIRINO, J. P., TERABE, S., BOCEK, P. (2000). Sweeping of neutral analytes in electrokinetic chromatography with high-salt-containing matrixes. ***Anal Chem*** 72, 1934-1940.

SANTOS, L. M. P., PEREIRA, M. Z. (2007). Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. ***Cadernos De Saude Publica*** 23, 17-24.

SZAKACS, Z., NOSZAI, B. (2006). Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. ***Electrophoresis*** 27, 3399-3409.

URBANEK, M., KRIVANKOVA, L., BOCEK, P. (2003). Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures. ***Electrophoresis*** 24, 466-485.

UYSAL, U. D., ONCU-KAYA, E. M., TUNCEL, M. (2010). Determination of Folic Acid by CE in Various Cultivated Variety of Lentils. ***Chromatographia*** 71, 653-658.

ZHAO, S. L., YUAN, H. Y., XIE, C., XIAO, D. (2006). Determination of folic acid by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. ***J Chromatogr A*** 1107, 290-293.

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DE CORANTES SUDAN I-IV EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR COM PREENCHIMENTO PARCIAL DO CAPILAR COM DETECÇÃO UV E MS

Resumo

Um método para análise de corantes Sudan (I, II, III e IV) em alimentos foi desenvolvida por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) com acoplamento ao espectrômetro de massas (MS). Com objetivo de desenvolver um método compatível com MS o método de preenchimento parcial do capilar foi aplicado. A separação dos compostos por MEKC assim como o preenchimento parcial do capilar foram otimizados por CE-UV. Esta técnica é necessária para evitar a entrada de micelas ao MS, uma vez que são compostos não voláteis contaminam a fonte de íons. A separação dos quatro corantes foi obtida utilizando-se um preenchimento de 25% do capilar (volume total) com eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5% ACN (v/v). O restante do capilar foi preenchido com um tampão composto de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% (v/v) de ACN. Após otimização do método por CE-UV o método foi aplicado para o acoplamento ao CE-ESI-MS. Para detecção dos compostos no MS os parâmetros de ionização foram otimizados. A separação em linha de base dos quatro compostos foi obtida em menos de 10 min com limites de detecção de 0,57 a 0,75 µg mL^{-1} para detecção no UV-Vis e 0,05 a 0,2 µg mL^{-1} para detecção no MS. O método foi eficaz para a determinação destes corantes adicionados a amostras de molho de tomate e pimenta e *chilli* em pó.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de corantes em alimentos tem sido freqüente, principalmente nos produtos industrializados. Muitos alimentos processados não apresentam cor originalmente e, em outros, a cor natural é alterada ou destruída durante o processamento e/ou estocagem. Com isso o uso de corantes para suplementar ou realçar a coloração perdida e, principalmente, para aumentar a aceitabilidade do produto frente ao consumidor é praticado.

O emprego de aditivos artificiais tem gerado polêmica e alguns corantes sintéticos podem ser tóxicos, especialmente se forem consumidos em grandes quantidades. Órgãos de regulamentação européia notificaram a presença do corante Sudan I em alimentos como pimenta *chilli* e *curry* em pó, assim como produtos contendo estes ingredientes (molho de pimenta e molho de tomate) (Commission of the European Communities, 2003). Este composto tem sido aplicado ilegalmente por indústrias de alimentos para manter a aparência dos produtos. Devido ao seu potencial carcinogênico e mutagênico sua presença na cadeia alimentar representa um risco à saúde pública.

Os corantes Sudan I-IV são compostos orgânicos sintéticos caracterizados pelo grupo cromofórico azo (Veja Fig. 1) e amplamente utilizados na indústria química para colorir materiais como gasolina, diesel, lubrificantes, plásticos, graxas e tintas para impressão (Calbiani *et al.*, 2004a; Cornet *et al.*, 2006). Estes compostos são classificados na categoria 3 de risco carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) por induzir algumas formas de câncer de fígado e bexiga em animais (An *et al.*, 2007).

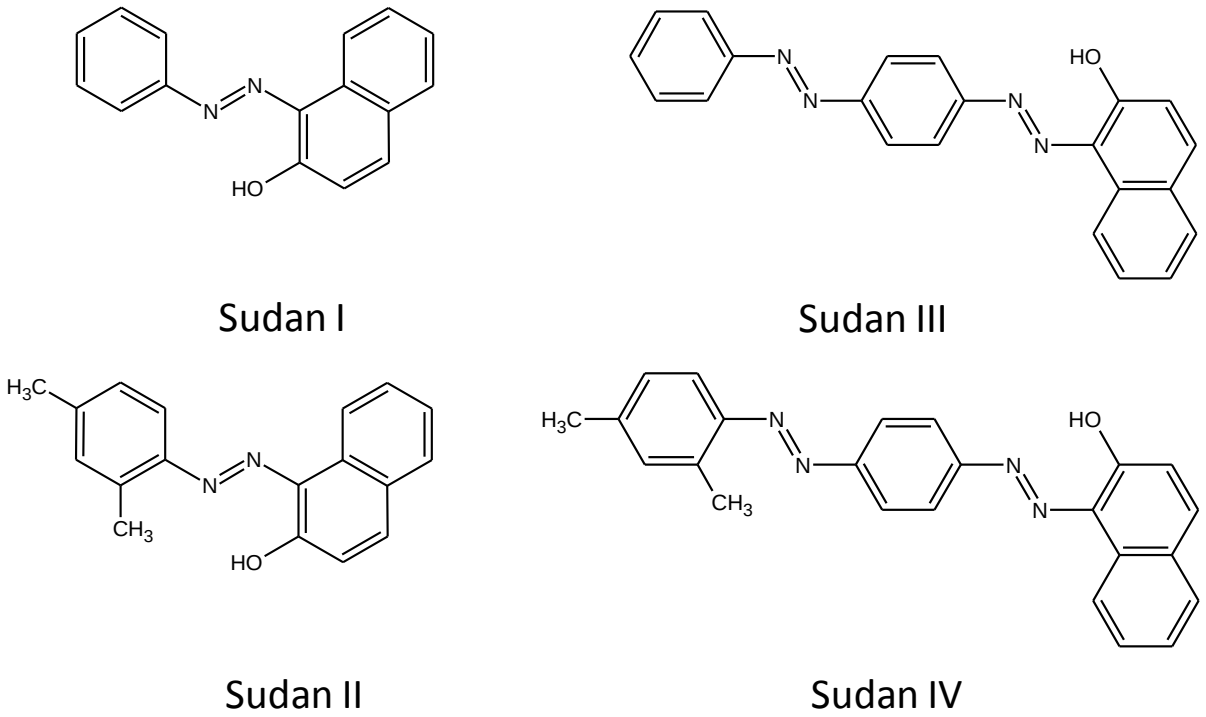


Figura 1. Estruturas dos corantes Sudan I-IV.

A União Européia tem controlado a comercialização e importação de produtos contendo pimenta *chilli*, *curry* e óleo de palma. Devido ao uso ilícito dos corantes da classe Sudan em alimentos incluindo casos de contaminação de pimenta em pó (hot chilli) e produtos derivados oriundos da Índia e comercializados na União Européia (Calbiani *et al.*, 2004b), sua determinação em diferentes matrizes tem ganhado atenção em pesquisas recentes (Rebane *et al.*, 2010). No Brasil nenhum registro sobre a presença deste corante em alimentos foi publicado.

A investigação dos corantes Sudan em alimentos é uma medida de segurança e requer métodos analíticos para identificá-los em matrizes alimentícias. Vários métodos foram propostos, principalmente envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis (Cornet *et al.*, 2006; Buddhadasa *et al.*, 2007; Ertas *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Uematsu *et al.*, 2007) e métodos de

cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (Calbiani *et al.*, 2004b; Molder *et al.*, 2007; Noguerol-Cal *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Pardo *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2010).

Apesar da eletroforese capilar ser amplamente utilizada para análise de aditivos e contaminantes de alimentos (Herrero *et al.*, 2010) a determinação do Sudan foi relatada apenas em dois artigos (Liu *et al.*, 2007; Mejia *et al.*, 2007). Mejia *et al.* (2007) desenvolveu um método por MEKC com detecção UV, enquanto que Liu *et al.* (2007) aplicou a eletrocromatografia capilar (CEC) pressurizada com detecção amperométrica. Ambos os métodos foram aplicados para a determinação de Sudan I-IV em produtos de pimenta (*hot chilli*). Nenhum trabalho sobre a determinação de corantes Sudan I-IV em alimentos por CE-MS foi publicado.

A detecção por UV-Vis tem sido frequentemente usada, entretanto, a detecção por MS tem sido aplicada cada vez mais por oferecer melhores possibilidades de identificação. O acoplamento do detector de MS ao CE é uma importante ferramenta para a separação e identificação de contaminantes em alimentos (Andreu *et al.*, 2007; Font *et al.*, 2008). O acoplamento on-line de um sistema MEKC ao MS com fonte eletrospray (ESI) resulta na perda de sinal do analito, promovida pela presença contínua de micelas no eletrólito. Neste caso, para evitar a contaminação do detector pelos componentes não voláteis do eletrólito, a técnica de preenchimento parcial do capilar, conhecida como *partial filling* (PF), é utilizada. Nesta técnica o capilar é primeiramente preenchido com o eletrólito volátil (compatível com MS), seguido pela introdução do eletrólito micelar e, finalmente, pela injeção da amostra. Após aplicação de tensão, os analitos se separam no eletrólito micelar de acordo com o grau de interação soluto-micela e, então, migram para o eletrólito volátil, livre de tensoativo, seguindo em velocidade constante até o

detector (Fig. 2). A corrente é interrompida antes que o eletrólito micelar alcance o detector, evitando assim a contaminação deste (Muijselaar *et al.*, 1998; Assunção *et al.*, 2008).

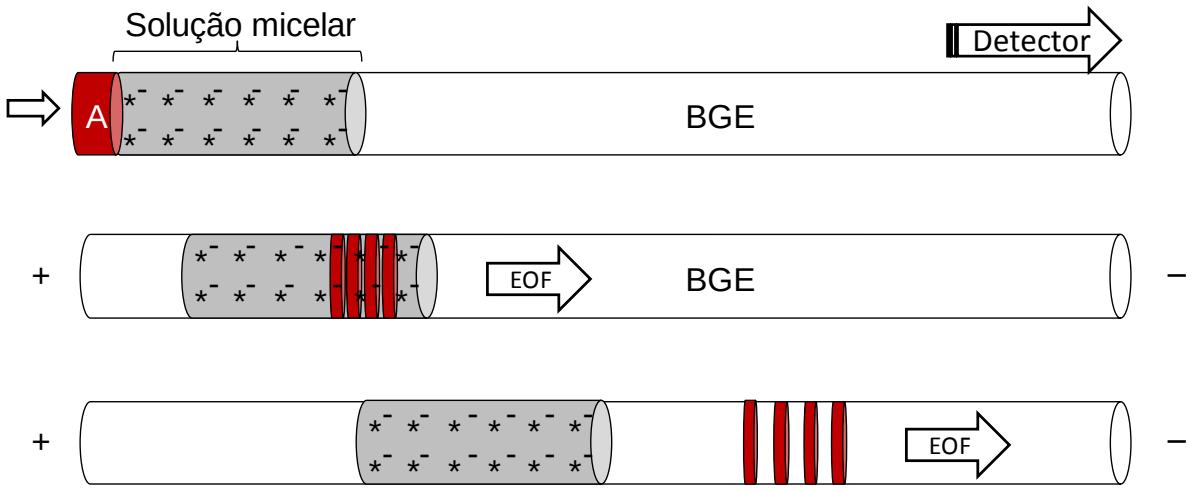


Figura 2. Esquema do procedimento utilizado na técnica de preenchimento parcial do capilar com solução micelar. Onde A é o plug de amostra, BGE o eletrólito de corrida volátil e EOF o sentido do fluxo eletrosmótico.

Neste trabalho, o método de separação dos corantes Sudan I-IV com preenchimento parcial do capilar e detecção MS para determinação simultânea dos corantes em produtos de pimenta é apresentado.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, MA, E.U.A.). Acetonitrila (ACN), acetona, diclorometano e metanol foram de pureza cromatográfica e obtidos da Lab-Scan (Gliwice, Polônia).

Soluções eletrolíticas foram preparadas diariamente para concentrações desejadas pela diluição de soluções estoque de 100 mmol L^{-1} de bicarbonato de amônio (Fluka, Buchs, Suíça) e 100 mmol L^{-1} de dodecilsulfato de sódio (SDS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.).

Sudan I (1-(fenilazo)-2-naftalenol) e Sudan II (1-[(2,4-dimetilfenil)azo]-2-naftol) foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, E.U.A.). Sudan III (1-[[4-(fenilazo)fenilazo]azo]-2-naftalenol) e Sudan IV (1-[[2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo]fenil]azo]-2-naftalenol) foram obtidos de Fluka (Buchs, Suíça). Soluções estoque dos padrões foram diluídos em acetona, preparados nas concentrações de 1 mg mL^{-1} para Sudan I e II e 0,25 mg mL^{-1} para Sudan III e IV e estocados a 4 ºC até o uso. Soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoque em acetona com posterior diluição em eletrólito antes da injeção. Para curva de calibração, soluções em concentrações de 2,5 a 20 µg mL^{-1} de cada corante foram preparadas pela diluição apropriada das soluções estoque em acetona, e posterior diluição em eletrólito antes da injeção. Para injeção, as amostras foram dissolvidas em eletrólito na proporção de 1:1 (v/v) em tampão micelar composto por 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} de SDS e 30% (v/v) ACN. Posteriormente foi observado que o aumento da concentração de NH_4HCO_3 e SDS melhorou a forma dos picos, assim,

a solução micelar utilizada para dissolver a amostra (1:1 v/v) foi de 60 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 50 mmol L^{-1} de SDS e 30% (v/v) ACN.

O composto flumequina (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha) foi utilizado como padrão interno. Este foi adicionado às amostras em concentração de 10 µg mL^{-1} preparados pela diluição da solução estoque de 1 mg mL^{-1} em acetona.

2.2 Preparo de amostra

Amostras de molho de pimenta, molho de tomate com *chilli* e *chilli* em pó foram adquiridas em mercado local de Madrid, Espanha. As amostras de molho de tomate com *chilli* foram: Salsa Brava (Carrefour – Espanha), Salsa Ranchera (La Costeña - México) e Salsa Taquera (La Costeña – México). A amostra de *chilli* em pó foi proveniente da Natco Foods (Reino unido). Para o processo de extração foi utilizada uma mistura de solventes composta de acetona, diclorometano e metanol na proporção de 3:2:1 (v/v/v) respectivamente, baseado no método proposto por Ertas *et al.* (Ertas *et al.*, 2007), com modificações. Cerca de 1,0 g de amostra foi pesado em um tubo de amostra de centrifugação e diluído com 10 mL da mistura de solventes acima mencionada. A amostra foi agitada em vortex por 2 min, submetida a ultrassom por 5 min e centrifugada por 5 min a 10000 rpm para precipitar os sólidos. O sobrenadante foi coletado e evaporado em rotavapor. O resíduo seco foi resuspendido em 1 mL de acetona contendo o padrão interno. Esta solução foi diluída em eletrólito (60 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 50 mmol L^{-1} de SDS e 30% v/v ACN) na proporção 1:1 (v/v) antes da injeção.

2.3 Condições Instrumentais CE-UV

Inicialmente os experimentos foram conduzidos em sistema de eletroforese capilar (P/ACE MDQ, Beckman Instruments, Fullerton, CA, E.U.A.) equipado com um detector UV a 214 nm, com controle de temperatura mantida a 25º C e aquisição de dados feita através do software 32 Karat™ (Beckman P/ACE System Gold Software). As injeções das amostras foram realizadas hidrodinamicamente com pressões de 0,5 psi por 5 s. O sistema eletroforético foi operado com polaridade normal e condições de tensão especificadas nos eletroferogramas.

Os capilares utilizados nos experimentos foram constituídos de sílica fundida, revestidos externamente com poli-imida, com 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. O comprimento total do capilar utilizado foi de 60 cm e o comprimento efetivo de 50 cm. O condicionamento inicial de capilares novos foi efetuado através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (20 psi/30 min) e água deionizada (20 psi/30 min). O condicionamento do capilar no início de cada dia foi feito através de lavagem com NaOH 0,1 mol L^{-1} (20 psi/10 min), água (20 psi/10 min) e eletrólito (20 psi/5 min), composto de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% (v/v) ACN. No final do dia o capilar foi lavado com NaOH 1 mol L^{-1} (20 psi/5 min) e água (20 psi/5 min). No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com acetona (20 psi/2 min), NaOH 0,1 mol L^{-1} (20 psi/2 min), água (20 psi/2 min) e eletrólito (20 psi/5 min) composto de 40 mM NH_4HCO_3 e 32,5% (v/v) ACN. Em seguida, para o preenchimento parcial do capilar o eletrólito micelar foi injetado por pressão, de modo a preencher um volume representado como porcentagem do capilar e indicado em cada caso. O comprimento do plug de solução MEKC

introduzido variou de 25% (10 psi/14,6 s) a 75% (10 psi/44 s) do volume total do capilar (calculado com auxílio do programa CE Expert 1.0, Beckman Instruments). As amostras foram injetadas ao capilar a 0,5 psi por 5 s. Finalmente, a separação foi realizada com aplicação de tensão de +30 kV, os eletrólitos contidos nos vials dos eletrodos foram compostos do BGE, isento de SDS, empregado no sistema de preenchimento parcial. O comprimento de onda de detecção foi mantido a 214 nm.

2.4 Condições Instrumentais CE-MS

Experimentos de PF-MEKC-MS foram realizados pelo acoplamento de um sistema de eletroforese capilar ao espectrômetro de massas. O sistema de CE (P/ACE 5010 Beckman Instruments, Fullerton, CA, E.U.A.) com detecção UV, controle de temperatura por líquido refrigerante e programa de aquisição e tratamento de dados pelo software Gold® (Bekman Coulter). O espectrômetro de massas foi do tipo armadilha de íons (*ion trap* – IT) modelo *Esquire* 2000 (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemanha), equipado com interface do tipo *electrospray* ortogonal modelo G1607A (Agilent Technlogies, Palo Alto, CA, E.U.A.). A aquisição de dados por MS foi controlada pelo *software Esquire NT* (Bruker Daltonics). O contato elétrico da interface foi estabelecido através de líquido auxiliar coaxial, composto de isopropanol:água (50:50, v/v) com 0,1% de ácido fórmico. A vazão deste líquido foi controlada por um sistema de bombeamento com seringa (Cole Palmer, Vernon Hills, IL, E.U.A.) a uma vazão de 4 µL/min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (4,5 kV) e escaneamento de 100-400 m/z. Outros parâmetros utilizados foram: pressão de nebulização de 4,0 psi, vazão do gás de secagem de 4,0 L/min e temperatura de secagem de 200º C. Os analitos

também foram monitorados no modo de reações múltiplas (MRM). A janela de isolamento foi de 4,0 m/z e a amplitude de fragmentação foi de 0,8 V para Sudan II, 1,0 V para Sudan I e III e 1,2 V para Sudan IV.

As separações foram realizadas em capilares de sílica fundida, revestidos externamente com poli-imida, com 50 µm de diâmetro interno (375 µm de diâmetro externo) e comprimento total de 80 cm. O condicionamento do capilar foi o mesmo descrito para o procedimento anterior. O capilar foi preenchido com eletrólito composto de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% (v/v) ACN. Posteriormente, o preenchimento parcial do capilar foi efetuado pela introdução da solução micelar composta de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} de SDS e 32,5% (v/v) ACN a uma pressão de 20 psi por 13,2 s (25% do comprimento do capilar). As amostras foram introduzidas por injeção a 0,5 psi/6 s com tensão aplicada de 25 kV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Desenvolvimento de método de separação dos corantes azo por PF-MEKC-UV

Os corantes Sudan são compostos lipofílicos e fracamente ácidos com valores de pK_a em torno de 11,65 (Rebane *et al.*, 2010). Devido à dificuldade em se trabalhar com eletrólitos muito alcalinos a separação destes compostos foi estudada por MEKC. A MEKC é um modo de eletroforese capilar que permite a separação de compostos neutros pela interação destes compostos com micelas presentes no eletrólito como fase dispersa. A seletividade da separação se deve à migração diferenciada dos analitos neutros devido às diferentes interações com a fase dispersa. Inicialmente, diferentes sistemas de eletrólito compostas de tampões voláteis (acetato de amônio e bicarbonato de amônio) e SDS foram investigados, para separação dos compostos por MEKC. Diferentes solventes orgânicos foram adicionados ao eletrólito, com intuito de aumentar a solubilidade dos analitos pouco solúveis em água. Primeiramente, ensaios simples de solubilidade dos corantes em misturas de solvente:água (50:50, v/v) demonstraram maior solubilidade, quando utilizou-se acetonitrila, acetona e isopropanol. Mejia *et al*. (Mejia *et al.*, 2007) investigou o efeito de solventes orgânicos na separação de corantes Sudan por MEKC e verificou que a acetonitrila teve melhor efeito na separação dos compostos, em sistema de eletrólito composto de tetraborato de sódio e SDS. Assim, neste trabalho, o efeito de diferentes concentrações de NH_4HCO_3 (10 a 30 mmol L^{-1}), SDS (25 a 50 mmol L^{-1}) e porcentagem acetonitrila (25 a 50%) foram investigados para separação dos corantes por MEKC. A separação dos quatro corantes foi obtida com

uma composição de eletrólito de 30 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v) como ilustrada na Figura 3 (A).

Apesar da obtenção da separação dos corantes Sudan por MEKC, a utilização desta composição de eletrólito não é compatível ao MS, devido à presença de altas concentrações de micelas (não voláteis). A presença deste surfactante promove a contaminação da fonte de íons, baixa eficiência de ionização e perda da sensibilidade do detector (Niessen *et al.*, 1993; Muijselaar *et al.*, 1998). Nestes casos, para evitar a entrada de micelas ao detector o método do preenchimento parcial do capilar foi empregado (PF). Em PF-MEKC, o capilar é primeiramente preenchido com eletrólito volátil, seguido pela introdução de um determinado volume de eletrólito micelar e, finalmente, pela injeção da amostra. Com a aplicação da tensão de separação, os analitos se separam no eletrólito micelar e migram para o eletrólito volátil, livre de tensoativo, seguindo até o detector com o fluxo eletrosmótico. O SDS por apresentar carga negativa no sistema tamponante empregado apresenta uma velocidade reduzida em polaridade normal. Assim, os analitos neutros migram na frente do plug de SDS e a tensão do sistema é interrompida antes que os surfactantes atinjam o detector de MS.

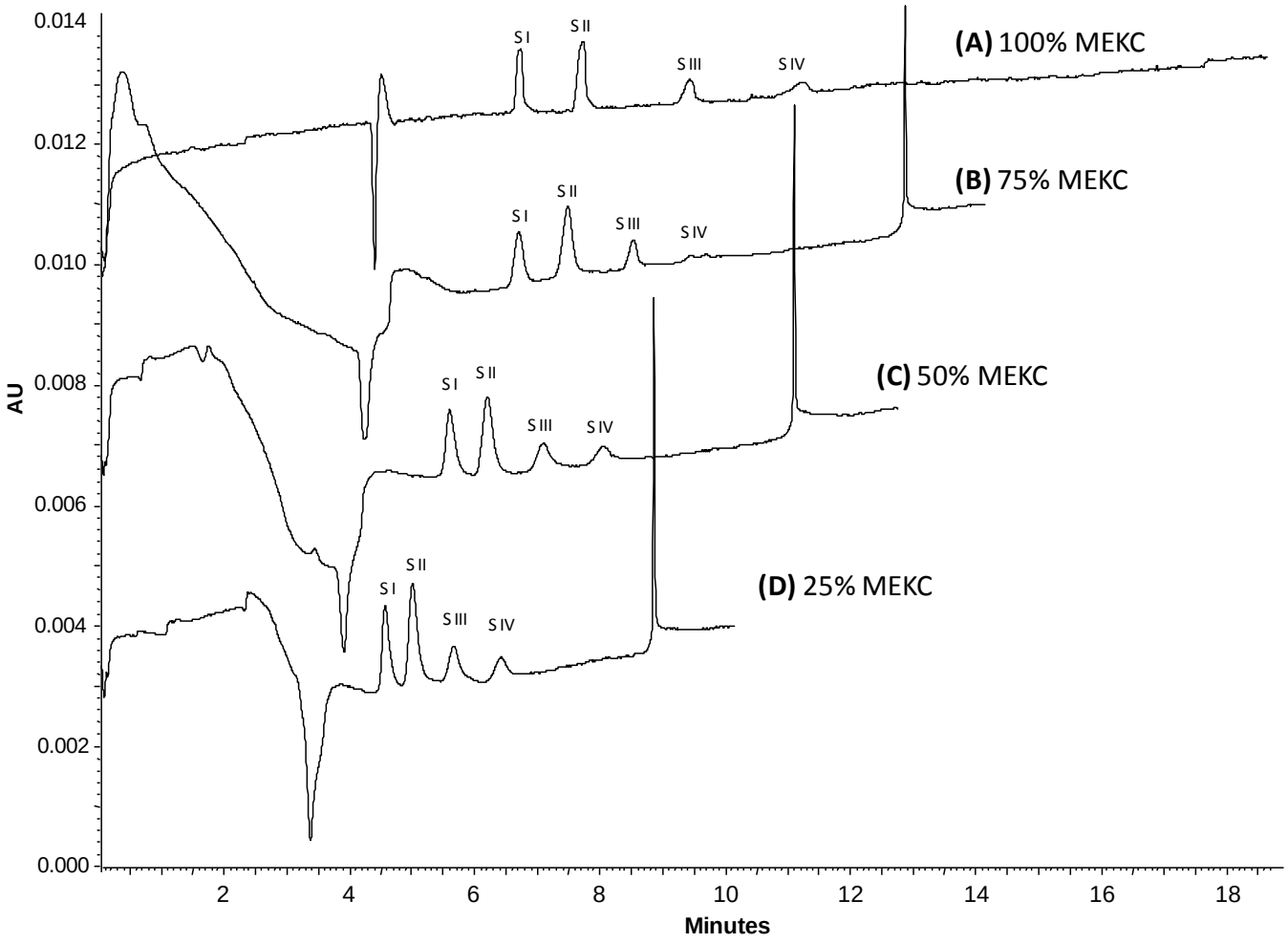


Figura 3. Eletroferogramas de uma mistura de padrões Sudan I-IV (20 µg mL^{-1} cada) por MEKC (A); e preenchimento parcial do capilar com solução MEKC de 75% (B); 50% (C) e 25% (D) do volume do total. Solução MEKC: 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v); BGE: 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 30% ACN (v/v). Outras condições: tensão aplicada de 30 kV; detecção a 214 nm; injeção da amostra a 0,5 psi por 5 s; capilar de 50 µm d.i., 60 cm comprim. total e 50 cm até o detector.

Considerando-se que o processo de separação por PF ocorre somente dentro do plug da solução micelar, o comprimento do plug introduzido foi otimizado. A Figura 4 ilustra o procedimento empregado e os eletroferogramas obtidos encontram-se na Figura 3 B-D. Assim, a solução MEKC composta de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v) foi empregada para preencher um volume correspondente a 75, 50 e 25% do volume do capilar. O restante do capilar foi preenchido com eletrólito (BGE) volátil com 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 30% ACN (v/v). De acordo com os resultados, a técnica de preenchimento parcial do capilar foi eficaz para a separação em linha de base dos quatro corantes quando o capilar foi preenchido com 75, 50 e 25% do volume do capilar. O preenchimento de 25% do volume do capilar com solução MEKC apresentou a melhor condição de separação considerando-se o menor tempo de análise e melhores formatos de pico como demonstrado na Figura 4 D.

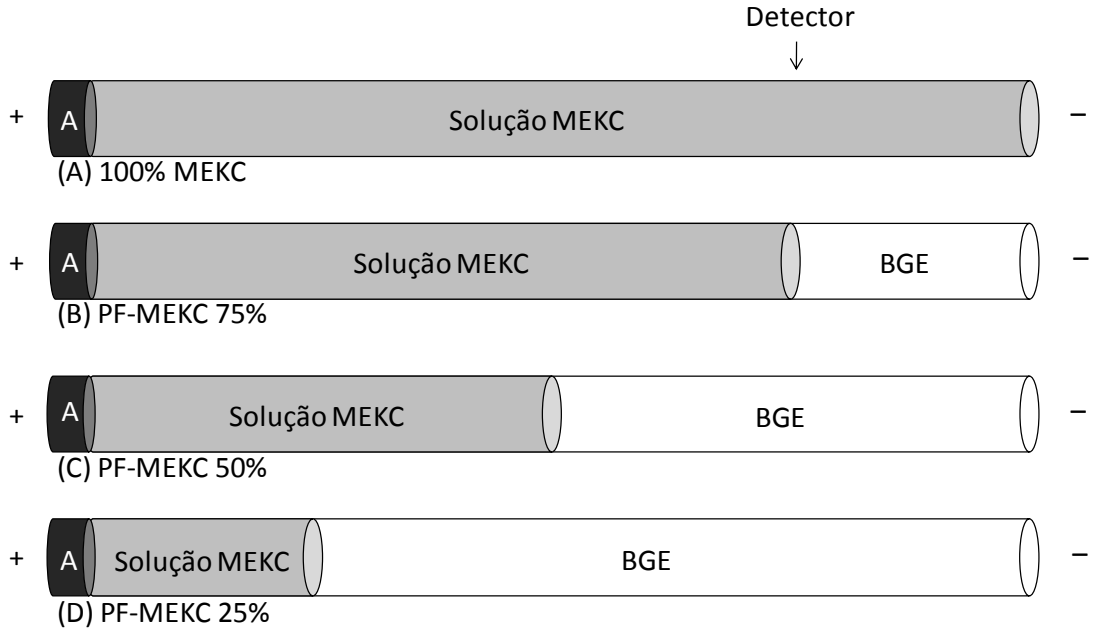


Figura 4. Esquema do estudo do comprimento do preenchimento parcial do capilar com solução micelar (solução MEKC). BGE é o eletrólito volátil isento de SDS e A é a amostra.

Posteriormente, o efeito da concentração de NH_4HCO_3, SDS e porcentagem de ACN na separação dos analitos por PF-MEKC foram investigadas. A Figura 5 ilustra a variação da concentração de SDS da solução micelar utilizada no preenchimento parcial de 25% do volume do capilar. A concentração de 15 mmol L^{-1} de SDS não proporcionou a migração diferenciada dos analitos e ocorreu a comigração dos compostos. Por outro lado, o aumento da concentração de SDS para 50 mmol L^{-1} aumentou o tempo de retenção e alargamento dos picos. Assim, a concentração de 25 mmol L^{-1} de SDS foi mantida para os demais estudos.

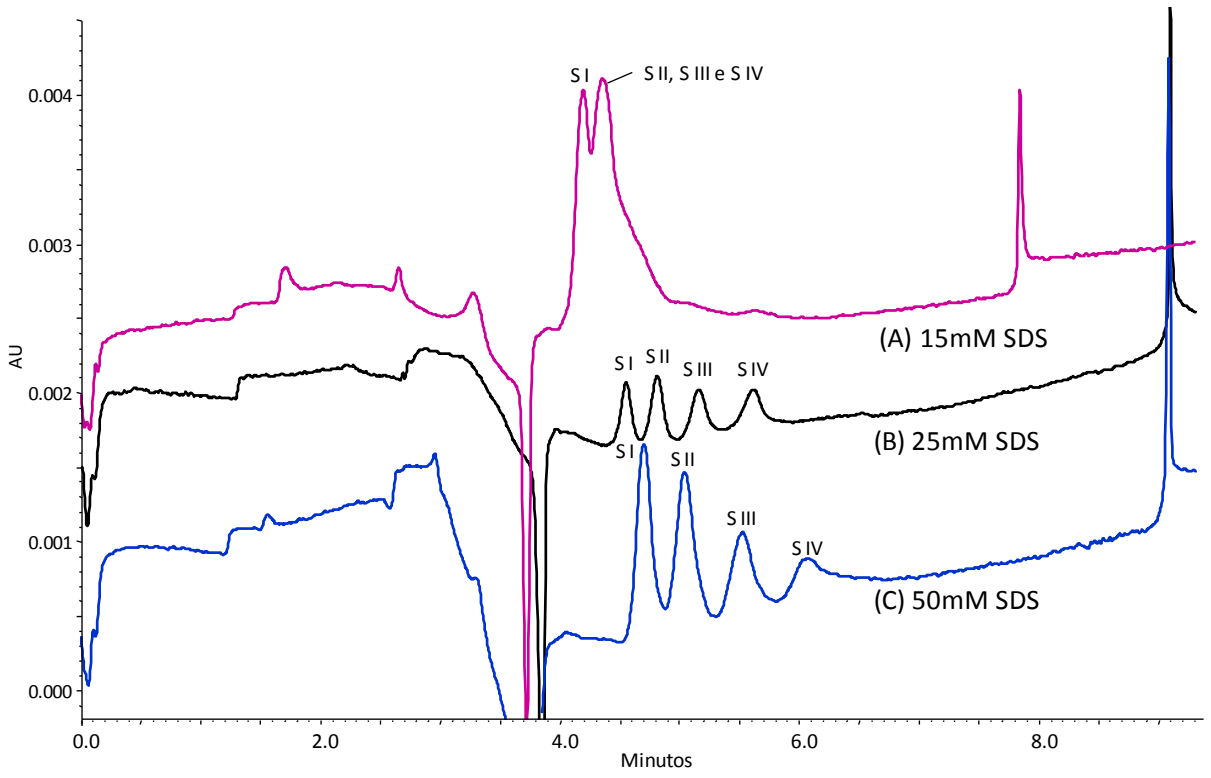


Figura 5. Efeito da concentração de SDS no PF-MEKC de uma mistura de Sudan I-IV (10 µg mL^{-1} cada). Preenchimento de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 30% ACN (v/v) e 15 mmol L^{-1} SDS (A), 25 mmol L^{-1} SDS (B) e 50 mmol L^{-1} SDS (C); BGE de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 30% ACN (v/v). Outras condições como citadas na Fig. 2.

A concentração de NH_4HCO_3 foi avaliada em valores de 20 a 40 mmol L^{-1}. A mesma concentração de NH_4HCO_3 utilizada na solução MEKC também foi aplicada

ao BGE. Como ilustrado na Figura 6, com o aumento da concentração de bicarbonato foram observados o alargamento de pico e aumento do tempo de retenção dos analitos. A diminuição da concentração para 20 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3 diminui a resolução entre os picos. Assim, a concentração de 30 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3 foi escolhida para a procedência dos experimentos.

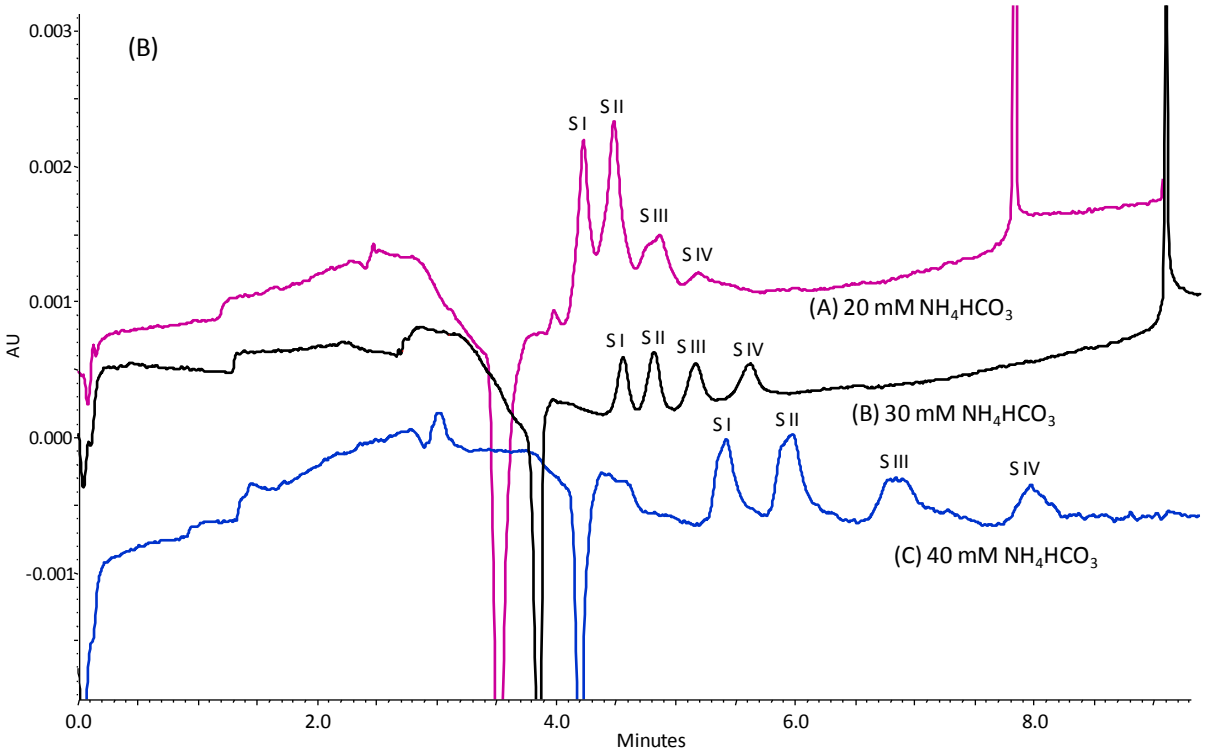


Figura 6. Efeito da concentração de bicarbonato de amônio na separação por PF-MEKC de uma mistura de Sudan I-IV (10 µg mL^{-1} cada). Preenchimento de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 20 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (A), 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (B) e 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (C), 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v); BGE de 20 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (A), 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (B) e 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (C) e 30% ACN (v/v). Outras condições como citadas na Fig. 2.

A adição de solventes orgânicos ao eletrólito foi importante para solubilizar os corantes, que apresentam característica hidrofóbica. Muitas vezes os solventes orgânicos são utilizados em MEKC para melhorar a seletividade do método por alterar a polaridade da mistura, a viscosidade e o potencial zeta (Chen *et al.*, 1995).

Para avaliar o efeito da adição de acetonitrila ao sistema de PF-MEKC, a porcentagem de acetonitrila estudada foi de 30 a 40%. (v/v) mantendo-se a concentração de 30 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3 e 25 mmol L^{-1} de SDS. De acordo com os resultados, ilustrados na Figura 7, o aumento da porcentagem de ACN diminuiu a resolução entre os picos e com 40 % de ACN os quatro compostos encontram-se comigrados.

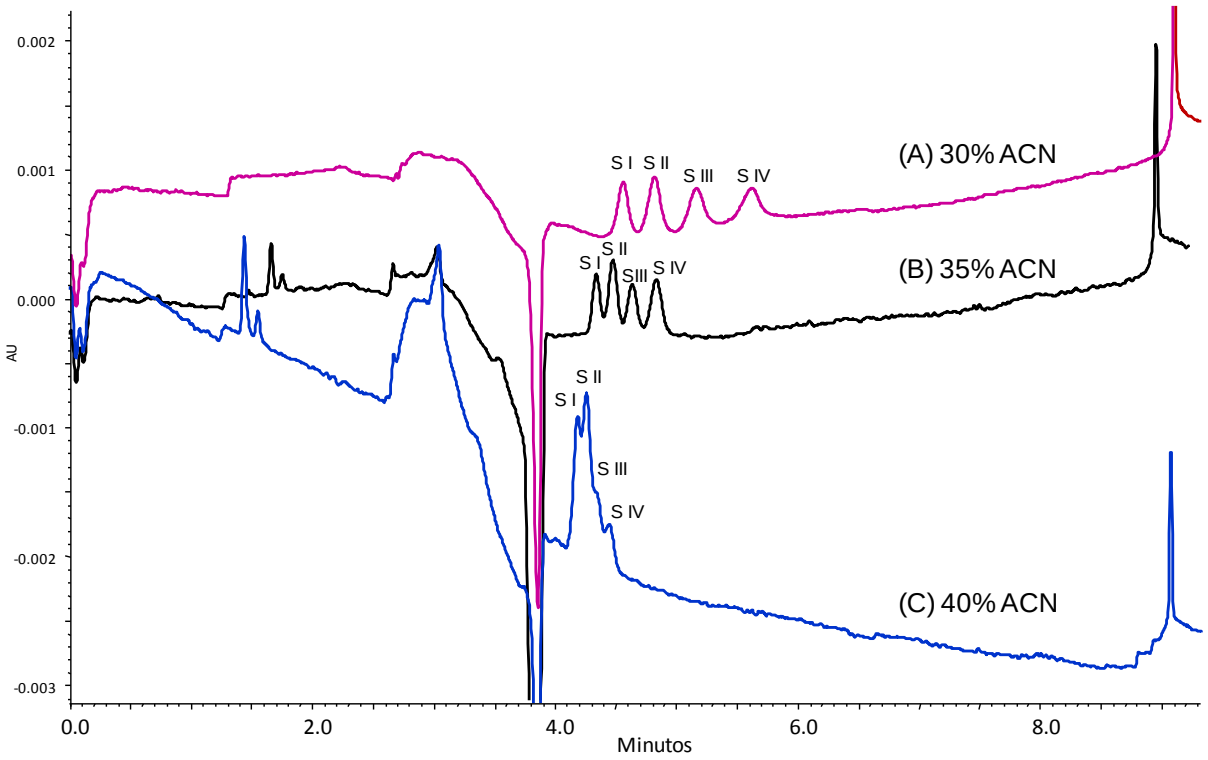


Figura 7. Efeito da porcentagem de acetonitrila na separação por PF-MEKC de uma mistura de Sudan I-IV (10 µg mL^{-1} cada). Preenchimento de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% (A), 35% (B) e 40% (C) ACN (v/v); BGE de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 30% (A), 35% (B) e 40% (C) ACN (v/v). Outras condições como citadas na Fig. 2.

Baseado nestes experimentos considerou-se como melhor condição de separação dos corantes azo o preenchimento parcial de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v) e BGE de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 30% ACN (v/v) (Fig 7 B). A condição selecionada foi aplicada para estudos de repetibilidade do método. Como observado

na Tabela 1 os valores de desvio padrão relativo variaram de 1,3 a 3,1% para tempo de análise e de 12,5 a 25,5% para área de pico. Os valores obtidos para área de pico não são aceitáveis para análise quantitativa. Esta variação pode ter ocorrido devido às condições de injeção da amostra e da alta porcentagem de solvente. No preparo das amostras, os padrões dissolvidos em acetona foram diluídos em eletrólito micelar (50:50, v/v), composto de 60 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3, 50 mmol L^{-1} de SDS e 30 % ACN, antes da injeção. A composição da amostra injetada contém uma grande porcentagem de solvente orgânico, que pode promover perdas de volume por volatilidade e alterações de viscosidade do meio, que podem influenciar na repetibilidade na etapa de injeção da amostra. Uma alternativa utilizada para corrigir este problema foi a adição de um padrão interno no preparo de amostra. Assim, o composto flumequina na concentração de 10 µg mL^{-1} foi usado como padrão interno, por não ser um interferente no tempo de migração dos analitos, apresentar similaridades de solubilidade e detecção. Utilizando a razão de área, calculada como razão da área de pico do analito pela área de padrão interno, foi possível melhorar cerca de 3 vezes os valores de %CV para Sudan I, II e III, como apresentado na Tabela 1. Entretanto, o valor de %CV para Sudan IV continuou alto (25,4%). Este fato pode ter sido provocado pela baixa solubilidade deste composto no eletrólito de separação, observada pelo formato de pico menos simétrico. Com objetivo de melhorar este resultado, um estudo adicional para melhorar a solubilidade dos compostos foi realizado.

Tabela 1. Resultados de repetibilidade e limite de detecção (LD) obtidos para a separação dos quarto corantes Sudan analisados por PF-MEKC.

Analito	**Repetibilidade (% C.V., n=10)**			**LD**
	Tempo de migração	**Área de pico**	**Razão de área***	**(µg mL^{-1})**
Sudan I	1,3	24,5	8,8	1,28
Sudan II	1,5	25,5	7,5	1,53
Sudan III	2,2	23,6	9,6	2,19
Sudan IV	3,1	12,5	25,4	3,07

* Razão de área (área do analito)/(área do padrão interno). Flumequina (10 µg mL^{-1}) foi utilizada como padrão interno.

A solubilidade dos corantes pode melhorar com o aumento da porcentagem de ACN de 30 a 35% (como demonstrado na Fig. 7), entretanto, não houve a completa separação dos compostos. Portanto, outros estudos de concentração de NH_4HCO_3, SDS e porcentagem de preenchimento parcial foram verificados com 35% de ACN (v/v). Como demonstrado na Figura 8, o aumento da concentração de bicarbonato com 35% de ACN, houve um ligeiro aumento da separação dos corantes. Mantendo-se a concentração de NH_4HCO_3 em 40 mmol L^{-1}, a variação da concentração de SDS (25 a 35 mmol L^{-1}) e da porcentagem de preenchimento parcial do capilar (25 a 75% do volume do capilar) não promoveram efeitos na separação dos corantes. Foi verificado apenas modificação no tempo de retenção dos compostos sem aumento de resolução.

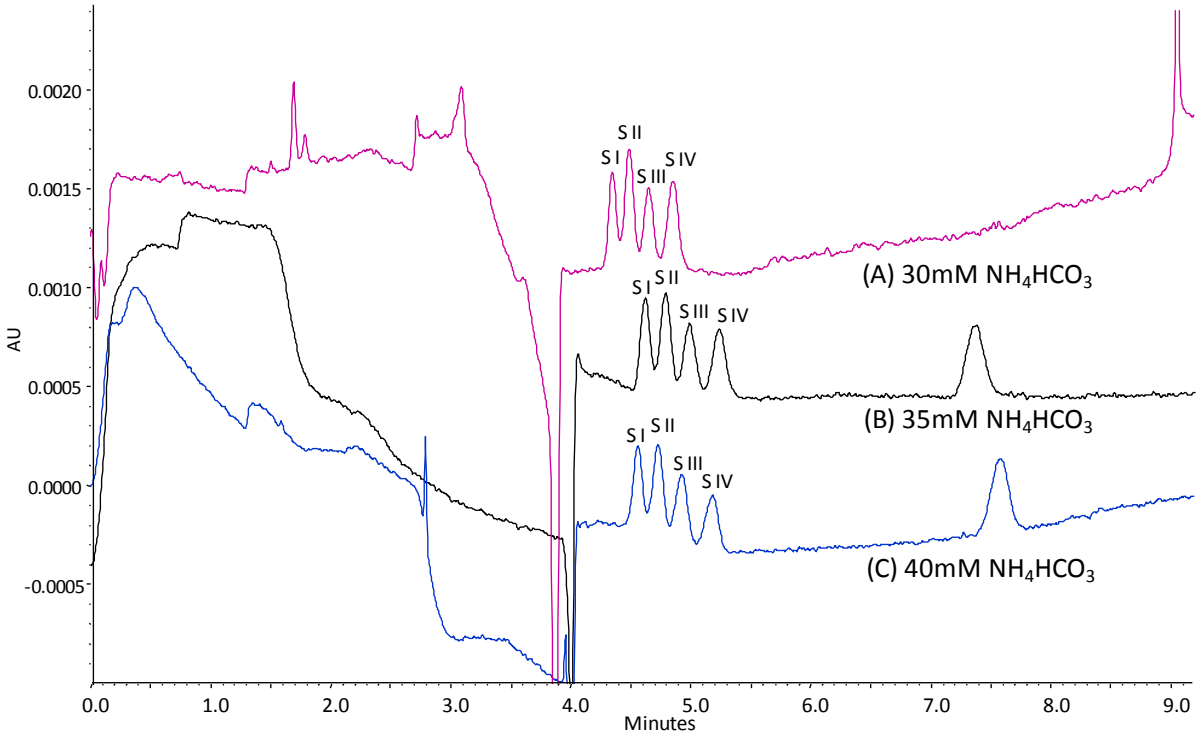


Figura 8. Efeito da concentração de bicarbonato de amônio na separação por PF-MEKC de uma mistura de Sudan I-IV (10 µg mL^{-1} cada). Preenchimento de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (A), 35 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (B) e 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (C), 25 mmol L^{-1} SDS e 35% ACN (v/v); BGE de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (A), 35 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (B) e 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 (C) e 35% ACN (v/v). Outras condições como citadas na Fig. 2.

Posteriormente, a separação em linha de base e melhor formato de pico dos quatro corantes Sudan foram obtidos com uma pequena modificação da porcentagem de ACN para 32,5% (v/v) (Figura 9). Assim, o preenchimento parcial de 25% do volume do capilar com solução MEKC de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5% ACN e BGE de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% ACN foi considerado como condição ótima, por apresentar melhores resultados de repetibilidade e sensibilidade como demonstrado na comparação dos resultados da Tabela 1 e 2. Os limites de detecção para Sudan I-IV diminuíram de 1,28-3,07 µg mL^{-1} para 0,57-0,71 µg mL^{-1}. Esta condição também foi favorável para melhorar o formato de pico do Sudan IV que apresentou um C.V. de 8,8%. Os resultados de

repetibilidade intradia e interdia demonstraram que o método pode ser aplicado em análises quantitativas por apresentar valores de C.V. menores que 10%.

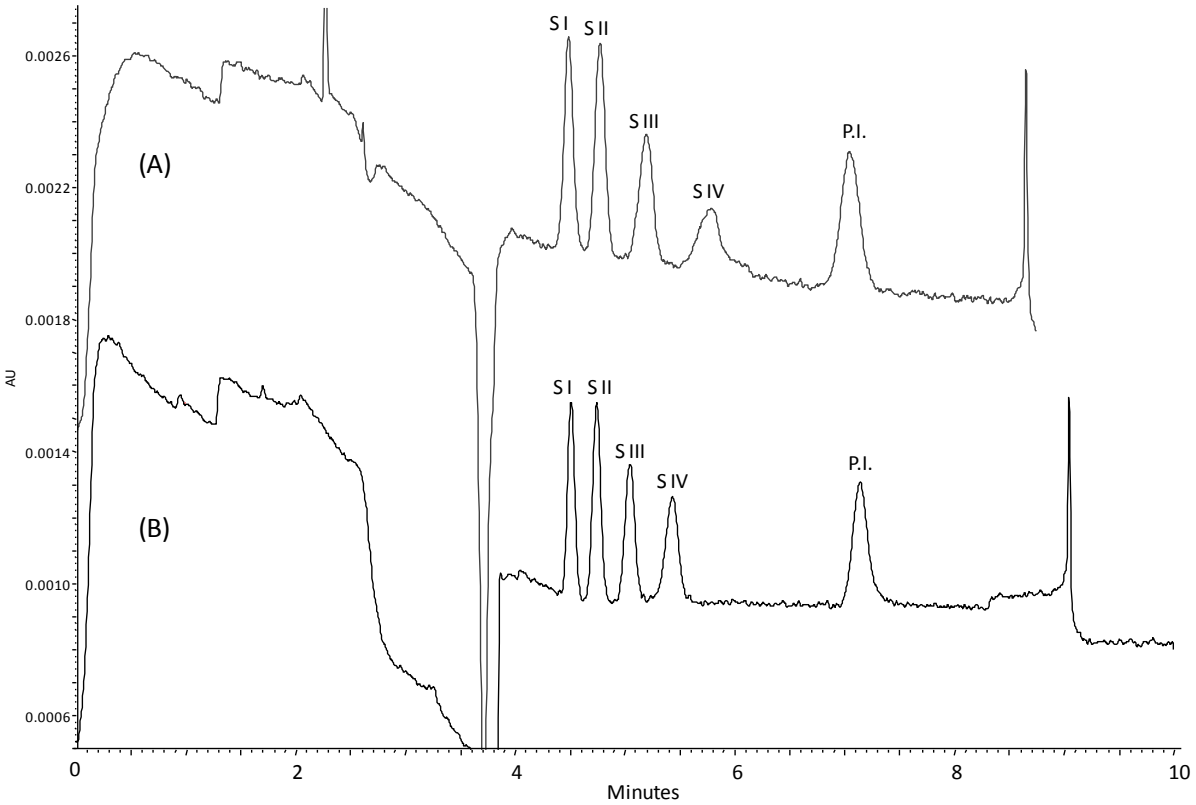


Figura 9. Eletroferogramas de uma mistura de Sudan I-IV (10 µg mL^{-1} cada) e padrão interno (P.I.) flumequina (10 µg mL^{-1}). Comparação das condições de PF-MEKC (25% do volume do capilar) com composição: (A) solução MEKC de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 30% ACN (v/v) e solução BGE de 30 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 30% ACN (v/v); (B) 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5% ACN (v/v) e solução BGE de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% ACN (v/v). Outras condições como citadas na Fig. 2.

Tabela 2. Resultados de precisão intradia e interdia e limites de detecção.

	Precisão intradia (%CV, n=10)		**Precisão interdia (%CV, n=15, 3 dias)**		**LD*** **(µg mL^{-1})**	**LQ**** **(µg mL^{-1})**
	Tempo de migração	**Razão de área*****	**Tempo de migração**	**Razão de área*****		
Sudan I	2,3	3,2	2,3	4,1	0,57	1,90
Sudan II	2,5	5,9	2,5	5,8	0,63	2,11
Sudan III	2,8	5,2	2,9	6,9	0,66	2,20
Sudan IV	3,2	8,8	3,3	9,9	0,71	2,37

*. Limite de detecção (LD) calculado como 3 vezes sinal/ruído.
**. Limite de quantificação (LQ) calculado como 10 vezes sinal/ruído.
***.Razão de área (área do analito)/(área do padrão interno). Flumequina (10 µg mL^{-1}) foi utilizada como padrão interno.

A linearidade do método foi demonstrada pela construção de curvas analíticas, relacionando valores de área relativa com concentrações de Sudan I-IV de 2,5 a 20 µg mL^{-1}. Valores de intercepto, inclinação, erro padrão da regressão (EP), coeficiente de correlação (R^2), F e *p* são apresentados na Tabela 3. Dentro da faixa linear estudada, os valores de R^2 foram de maiores que 0,99 para os quatro corantes, contribuindo para aplicação em análises qualitativas de Sudan I-IV em alimentos.

Tabela 3. Resultados de calibração da curva construída com valores de área relativa versus concentração de Sudan I-IV (2,5 a 20 µg mL^{-1}).

	Intercepto	**Inclinação da reta**	**EP**	**R^2**	**F**	***p***
Sudan I	0,040 ± 0,008	0,052 ± 0,001	0,017	0,997	5880	$3,8 \cdot 10^{-25}$
Sudan II	0,11 ± 0,013	0,061 ± 0,001	0,028	0,993	3103	$2,0 \cdot 10^{-23}$
Sudan III	0,085 ± 0,011	0,051 ± 0,001	0,023	0,994	3222	$1,1 \cdot 10^{-22}$
Sudan IV	0,038 ± 0,021	0,057 ± 0,001	0,026	0,994	3098	$1,6 \cdot 10^{-22}$

3.1.1 Aplicação do método PF-MEKC UV em amostras reais

O método proposto foi aplicado para identificação e determinação de corantes Sudan em três diferentes amostras de molho de pimenta com tomate. Devido ao fato de não terem sido encontradas amostras contaminadas com corante Sudan, padrões de Sudan I-IV foram adicionados às amostras, para determinar a exatidão e aplicabilidade do método.

A exatidão do método foi avaliada como a recuperação obtida de cada corante adicionado às amostras de molho de pimenta com tomate, em concentrações de 2,5 µg mL^{-1} para Sudan I e II, e de 5,0 µg mL^{-1} para Sudan III e IV. A Tabela 4 demonstra que os valores de recuperação obtidos para Sudan I e II foram de 92,1 a 99,0 % enquanto que os valores obtidos para Sudan III e IV foram menores (85,2 a 92,1%). De acordo com a literatura geralmente a recuperação do Sudan IV é menor em relação aos corantes I – III e os valores podem variar de acordo com o solvente utilizado para extração e o tipo de matriz (Rebane *et al.*, 2010).

Table 4. Valores de recuperação de Sudan I-IV de diferentes amostras de molho de tomate com *Chilli*. As concentrações dos padrões adicionados foram de 2,5 µg mL^{-1} de Sudan I e II e 5 µg mL^{-1} de Sudan III e IV.

Analitos	**Recuperação (%)**		
	Salsa Brava (Carrefour - ES)	**Salsa Ranchera (La Costeña - MX)**	**Salsa Taquera (La Costeña - MX)**
Sudan I	98,2 ± 1,0	95,2 ± 2,5	95,3 ± 6,1
Sudan II	99,0 ± 2,7	97,2 ± 1,1	92,1 ± 1,2
Sudan III	90,4 ± 1,2	92,1 ± 2,2	88,4 ± 4,2
Sudan IV	85,5 ± 5,2	90,4 ± 3,4	85,2 ± 2,5

A Figura 10 apresenta os eletroferogramas obtidos utilizando a condição otimizada para separação dos corantes Sudan I – IV em amostras de molho de pimenta com tomate. Este resultado demonstra a seletividade do método para determinação do Sudan I-IV neste tipo de matriz que não apresenta interferentes nos tempos de migração destes contaminantes.

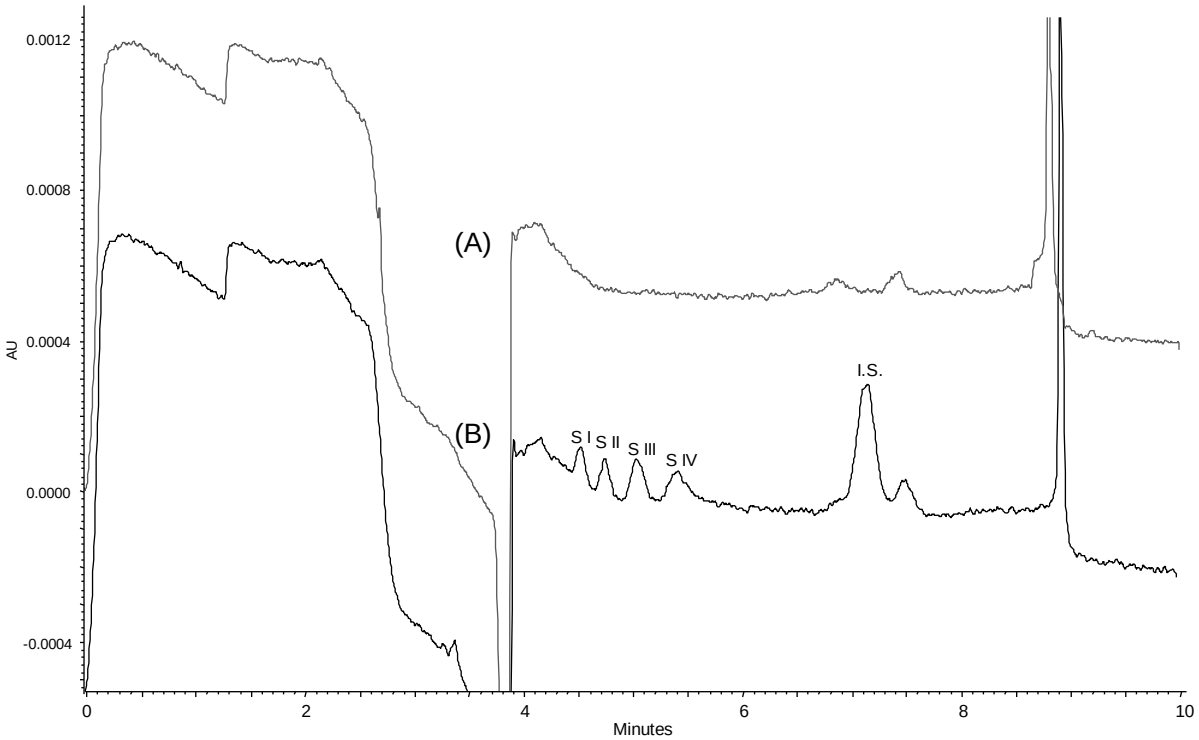


Figura 10. Eletroferogamas de amostras de molho de pimenta com tomate (A) e a mesma amostra com adição de 2,5 µg mL^{-1} de Sudan I e II e 5,0 µg mL^{-1} de Sudan III e IV (B). Condições de separação como citadas na Figura 8 B.

O método de PF-MEKC-UV também foi aplicado para determinação de contaminantes Sudan I-IV em amostras de pimenta *chilli* em pó. Entretanto, como ilustrado na Figura 11, não foi possível identificar a presença destes contaminantes adicionados à amostra, devido à grande interferência dos constituintes desta matriz por detecção UV a 210 nm. Este produto é amplamente utilizado na culinária indiana, contém uma mistura de especiarias e apresenta coloração vermelho

intenso, podendo assim conter diferentes substâncias interferentes em relação à amostra de molho de pimenta com tomate. Assim, outros métodos de detecção devem ser utilizados para a determinação dos contaminantes Sudan I-IV em amostras de pimenta *chilli* em pó.

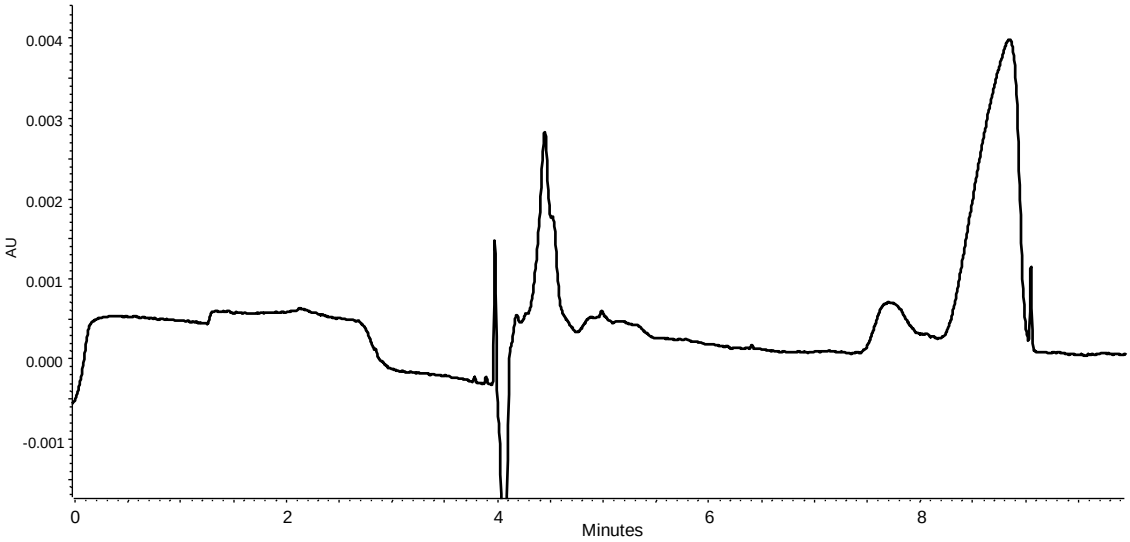


Figura 11. Eletroferograma da adição de 10 µg mL^{-1} de Sudan I-IV em amostra de pimenta *chilli* em pó. Condições de separação como citadas na Figura 8 B.

3.2. Desenvolvimento de método de separação dos corantes azo por PF-MEKC-MS

Devido ao fato da impossibilidade da determinação de corantes Sudan em amostras de pimenta *chilli* em pó por detecção UV, o acoplamento do método PF-MEKC com detecção MS foi investigada.

Inicialmente, diferentes parâmetros que afetam a sensibilidade e estabilidade do acoplamento de CE-MS como natureza do líquido auxiliar, temperatura e vazão do gás de secagem e ajustes do *ion trap*.

O acoplamento do CE-MS ocorre através de uma interface do tipo eletrospray (ESI). Neste acoplamento, o líquido auxiliar é introduzido através de um tubo de aço

inoxidável concêntrico ao capilar eletroforético, em vazões de nanolitros por minuto. A mistura entre o efluente eletroforético e o líquido auxiliar ocorre na extremidade do tubo. O gás nebulizador que auxilia na formação do spray, é introduzido através de um terceiro tubo concêntrico externo. O circuito eletroforético pode ser fechado pelo aterramento do capilar metálico do ESI (Assunção *et al.*, 2008).

Para otimizar as condições de ionização dos analitos, uma solução dos padrões de Sudan I-IV em acetona foram injetados continuamente pelo CE a uma pressão de 0,5 psi. Para selecionar um líquido auxiliar apropriado, diferentes misturas de água com acetonitrila, metanol ou isopropanol (50:50 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, foram testados. O ácido fórmico foi adicionado para aumentar a ionização dos compostos no modo positivo. Uma vez que o isopropanol foi escolhido como melhor solvente, a composição de 50:50 e 75:25 solvente:água (v/v), com diferentes porcentagens de ácido fórmico (0,1, 0,5 e 1%) foram testados. A variação da composição de 50:50 para 75:25 (v/v) não influenciaram no aumento de sinal. Entretanto, com o aumento na porcentagem de ácido fórmico houve uma diminuição no sinal de MS. Assim, uma composição de isopropanol:água (50:50 v/v) com 0,1% de ácido fórmico a uma vazão de 4 µL/min foi selecionada como líquido auxiliar do sistema. A influência da temperatura e vazão do gás de secagem foi investigada em valores de 150 a 250 ºC e 2 a 5 L/min, respectivamente. Apesar destes parâmetros não promoverem um grande aumento no sinal, maiores valores de intensidade foram obtidas quando se utilizou 200 ºC e vazão do gás de secagem de 4 L/min. Finalmente, os parâmetros do *ion trap* no modo automático foram estudados, sendo que a melhor intensidade de sinal foi obtida quando o ajuste de 100% de estabilidade dos compostos foram aplicados.

Para realizar análises em condições comparáveis ao método de PF-MEKC-UV desenvolvido, o tempo de injeção das amostras e do plugue da solução micelar, utilizados para o preenchimento parcial, foram adaptados ao maior comprimento de capilar necessário para o acoplamento instrumental do CE ao MS. Assim, as condições de injeção foram modificadas para 0,5 psi por 6 s para amostra e 20 psi por 13,2 s para preenchimento parcial de 25% do volume do capilar.

As condições de separação de Sudan I-IV otimizadas por PF-MEKC-UV juntamente com as condições de ionização otimizadas foram aplicadas a uma mistura de padrões. A Figura 12 demonstra o eletroferograma pico-base (*base-peak electropherogram*, BPE) e eletroferogramas dos íons extraídos (*extracted ion electropherogram,* EIE) obtidos de uma mistura de corantes. Como pode ser observado, utilizando um eletrospray no modo positivo (4,5 kV) os íons moleculares $[M-H]^+$ obtidos para Sudan I, II, III e IV foram respectivamente, 249,2, 277,2, 353,2 3 381,2 m/z. Este resultado demonstrou a possibilidade de detecção dos corantes Sudan por PF-MEKC-MS.

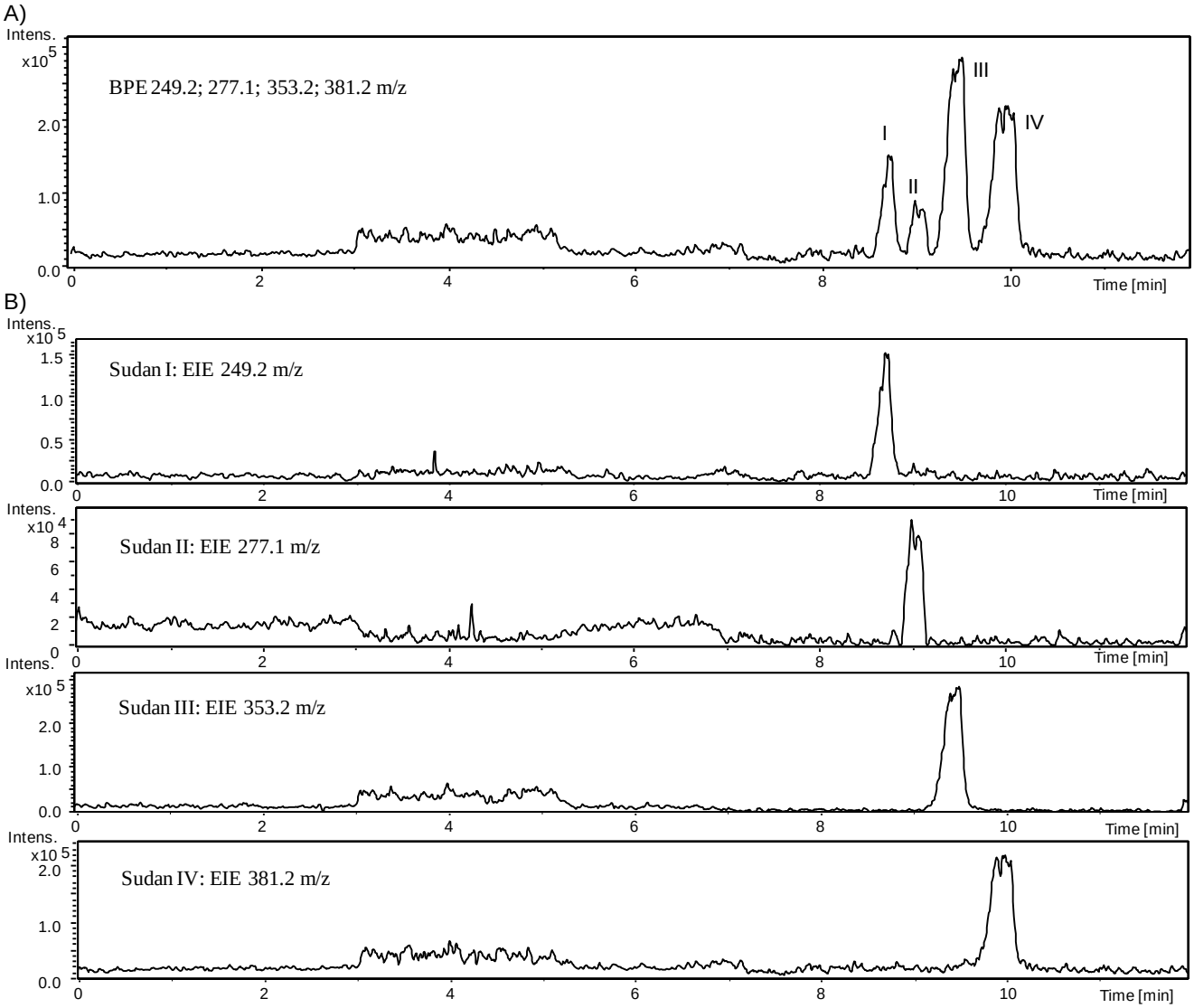


Figura 12. (A) Eletroferograma pico-base (BPE) e B) Eletroferogramas do íon extraído (EIE) de uma mistura de padrões de Sudan I, II, III e IV (5 µg mL^{-1} cada). Condições: BGE composto de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 e 32,5% ACN (v/v); preechimento parcial de 25% do volume do capilar com solução MEKC composta de 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5 % ACN (v/v). Capilar de sílica fundida, 50 µm d.i., 80 cm c.total; injeção da amostra a 0,5 psi × 6 s; tensão aplicada de 25 kV; temperatura, 25 ºC. Condições de ESI: modo de ionização positivo; tensão de spray de 4,5 kV; líquido auxiliar de isopropanol/água (50:50 v/v) com 0,1% acido fórmico a 4 µL/min; vazão do gás de secagem de 4 L/min; temperatura de secagem de 200 ºC; pressão do nebulizador de 4 psi.

No intuito de melhorar a sensibilidade do método, a possibilidade de realizar experimentos no modo MRM foi investigada. Com isso, os parâmetros que influenciam no experimento MS/MS foram otimizados para cada corante. A amplitude de fragmentação variou de 0,5 a 1,2 V e a janela de isolamento de 2 a 4 m/z. A escolha destes parâmetros foi baseada na maior intensidade dos íons filhos obtida na fragmentação de cada analito. A janela de isolamento foi mantida a 4 m/z para todos os corantes, enquanto que a amplitude de fragmentação foi diferente para cada composto como indicado na Tabela 5. O EIE e o espectro de massas correspondente à separação de padrões de Sudan I-IV utilizando o modo MRM são mostrados na Figura 13. Os íons filhos de maior intensidade obtidos da fragmentação foram selecionados como íons quantificadores e identificadores, respectivamente. Contudo, no caso do espectro de massas obtido para Sudan I, o íon de maior intensidade foi 232,2 m/z em vez de 233,2 m/z. O motivo desta escolha foi uma grande interferência observada quando se extraiu o íon molecular 232,2 m/z, foi observado um alto ruído na linha de base devido à presença contínua de um interferente de mesma massa presente no eletrólito. Por esta razão, o íon 233,2 m/z foi monitorado como íon quantificador para Sudan I, por diminuir o sinal do interferente e permitir sua detecção e aumentar a relação sinal/ruído.

Tabela 5. Espectro de massas e limites de detecção (LD) para análise de corantes Sudan utilizando PF-MEKC-MS e PF-MEKC-MS/MS.

Composto	Tempo(min)	Ìon precursor (m/z)	Amplitude de Fragmentação (V)	Ìons filhos (m/z)		LD (µg mL^{-1})	
				D_1*	D_2*	PF-MEKC-MS	PF-MEKC-MS/MS
Sudan I	8,3	249,2	1,0	233,2	231,2	1,50	0,20
Sudan II	8,7	277,1	0,8	260,2	120,4	1,67	0,11
Sudan III	9,0	353,2	1,2	197,1	336,0	0,52	0,10
Sudan IV	9,6	381,2	1,0	242,2	245,2	1,43	0,05

* O íon precursor e D_1 foram usados como íons quantificadores e D_2 foi usado com íon identificador

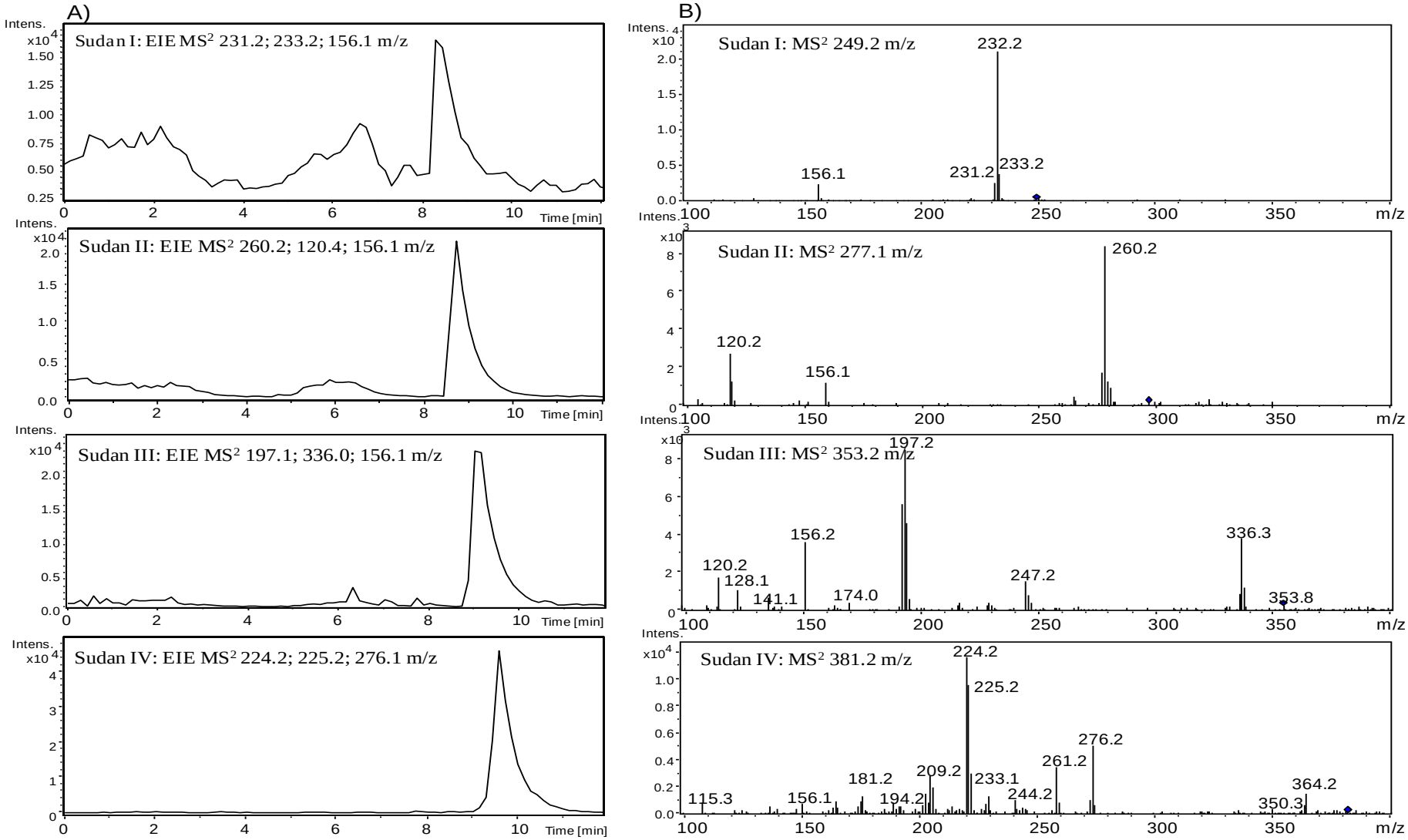


Figura 13. A) EIE de PF-MEKC-MS/MS e B) espectros MS/MS de uma mistura de padrões de Sudan I, II, III e IV (5 µg mL^{-1}). Transições MS/MS em modo MRM, largura de 4 m/z e amplitude de fragmentação de 1,00 V para Sudan I e IV, 0,8 V para Sudan II e 1,2 V para Sudan III. Outras condições como citado na Fig. 12.

A linearidade do método de PF-MEKC-MS/MS foi determinado utilizando-se uma faixa de concentração de 1 a 10 µg mL^{-1} para Sudan I e de 0,5 a 10 µg mL^{-1} para Sudan II, III e IV. Respostas lineares com coeficientes de regressão de 0,989, 0,988, 0,999 e 0,999 foram obtidos para Sudan I, II, III e IV, respectivamente. O limite de detecção foi calculado pela relação sinal/ruído igual a 3. Como mostrado na Tabela 5, os LDs obtidos por experimentos MS/MS foram melhores do que os experimentos por MS. Com isso, LDs de 0,05 a 0,2 µg mL^{-1} foram antingidos por PF-MEKC-MS/MS.

3.2.1 Aplicação em amostras reais

Como mencionado anteriormente, a detecção de corantes Sudan (I, II, III e IV) adicionadas em amostras de pimenta *chilli* em pó por PF-MEKC com detecção UV não foi possível devido à presença de interferentes da matriz (Figura 11). Por outro lado, a determinação destes compostos nesta mesma amostra por PF-MEKC com detecção MS/MS foi realizada com sucesso. A Figura 14 demonstra os EIEs correspondentes a uma amostra de pimenta *chilli* em pó adicionadas de 2,5 µg mL^{-1} de Sudan I, II, III e IV. Este resultado demonstra a seletividade e a sensibilidade do método de PF-MEKC-MS/MS desenvolvido, com adicional possibilidade de quantificação, que contribui para a análise de contaminantes Sudan em matrizes alimentícias.

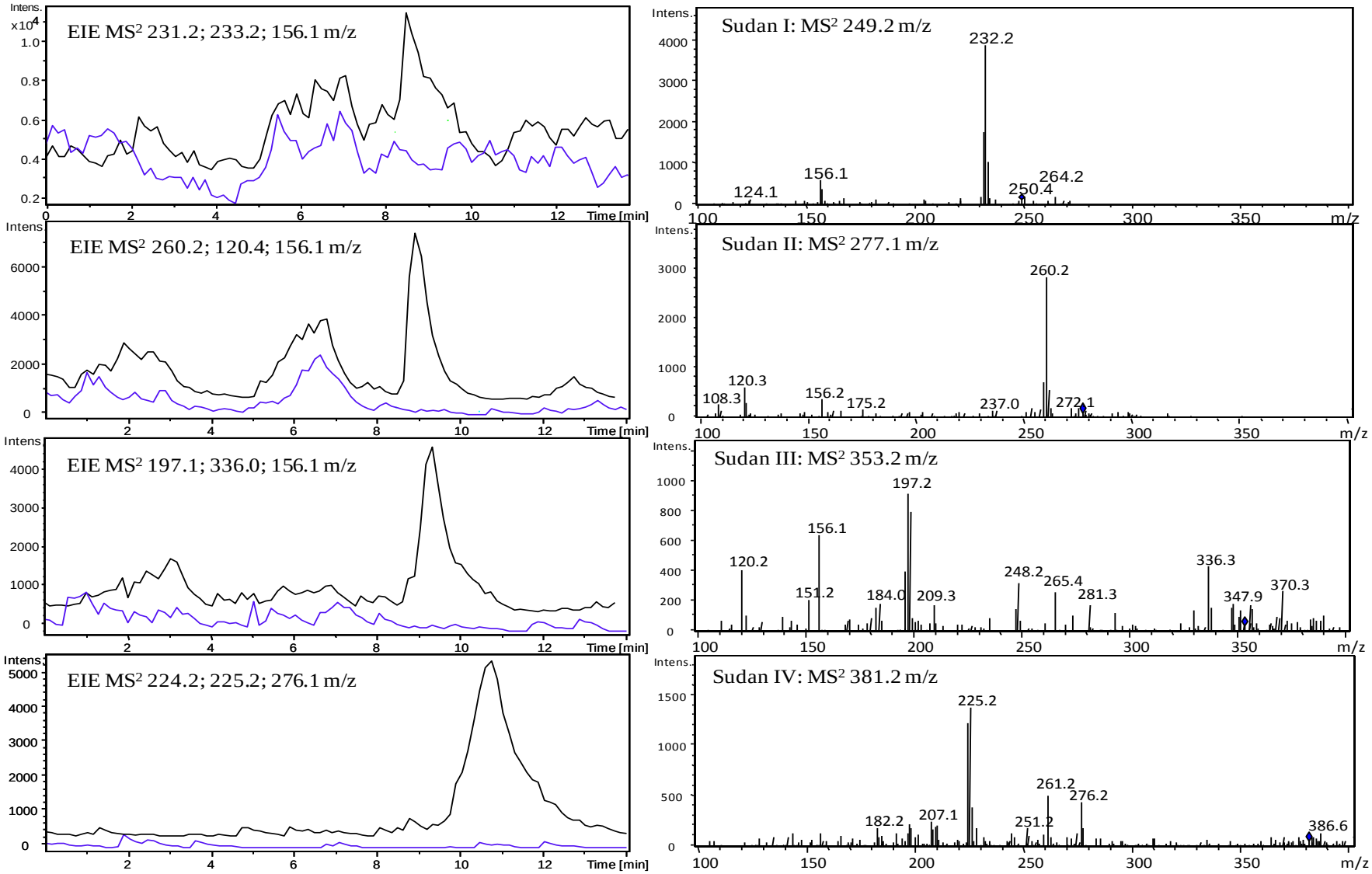


Figura 14. EIE de uma amostra de pimenta *chilli* em pó (—) e pimenta *chilli* em pó adicionada de uma mistura de padrões Sudan I, II, III e IV (2,5 µg mL^{-1} cada) (—). Espectros MS/MS correspondentes aos padrões de Sudan I-IV adicionados na amostra de pimenta *chilli* em pó. Outras condições como citadas na Fig. 11 e 12.

4. Conclusões

Neste trabalho, um novo método para determinação simultânea de corantes Sudan I-IV foi desenvolvido por preenchimento parcial do capilar e cromatografia eletrocinética micelar com detecção UV e MS/MS. A otimização de diferentes parâmetros que influenciam na separação e sensibilidade do método foram realizados. O uso de uma solução micelar contendo 40 mmol L^{-1} de NH_4HCO_3, 25 mmol L^{-1} SDS e 32,5% ACN (v/v), com preenchimento parcial de 25% do volume do capilar permitiu a separação em linha de base dos corantes Sudan (I, II, III e IV) com tempo de análise menor que 10 min. Os LDs obtidos foram de 0,57 a 0,71 µg mL^{-1} por detecção UV (210 nm) e de 0,05 a 0,2 µg mL^{-1} por detecção MS/MS. Apesar de amostras contaminadas não serem encontradas, o método proposto foi satisfatoriamente aplicado para a determinação de Sudan I-IV adicionadas a amostras de molho de pimenta e condimento de *chilli* em pó. O método proposto pode ser aplicado para a detecção e quantificação de amostras contaminadas com Sudan I-IV sendo ainda possível efetuar análises confirmatórias por MS/MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, Y., JIANG, L. P., CAO, J., GENG, C. Y., ZHONG, L. F. (2007). Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. ***Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*** 627, 164-170.

ANDREU, V., BLASCO, C., PICO, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. ***Trac-Trends in Analytical Chemistry*** 26, 534-556.

ASSUNÇÃO, N. A., BECHARA, E. J. H., SIMIONATO, A. V. C., TAVARES, M. F. M., CARRILHO, E. (2008). Eletroforese capilar acoplada à Espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. ***Química Nova*** 31, 2124-2133.

BUDDHADASA, S. C., MISHRA, V., MATTA, A. K., SANTHAKUMAR, N. (2007). Measurement of Sudan dyes I, II, III and IV residues in chilli powder. ***Food Australia*** 59, 439-441.

CALBIANI, F., CARERI, M., ELVIRI, L., MANGIA, A., PISTARA, L., ZAGNONI, I. (2004a). Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products. ***J. Chromatogr A*** 1042, 123-130.

CALBIANI, F., CARERI, M., ELVIRI, L., MANGIA, A., ZAGNONI, I. (2004b). Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A*** 1058, 127-135.

CHEN, N., TERABE, S., NAKAGAWA, T. (1995). Effect of Organic Modifier Concentrations on Electrokinetic Migrations in Micellar Electrokinetic Chromatography. ***Electrophoresis*** 16, 1457-1462.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). Comission Decision of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products (notified under document number C(2003) 1970) 2003/460/EC. ***Official Journal of European Union*** L 154/114.

CORNET, V., GOVAERT, Y., MOENS, G., VAN LOCO, J., DEGROODT, J. M. (2006). Development of a fast analytical method for the determination of sudan dyes in chili- and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. ***J. Agric. Food Chem.*** 54, 639-644.

ERTAS, E., OZER, H., ALASALVAR, C. (2007). A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. ***Food Chemistry*** 105, 756-760.

FONT, G., RUIZ, M. J., FERNANDEZ, M., PICO, Y. (2008). Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for determining organic food contaminants and residues. ***Electrophoresis*** 29, 2059-2078.

HE, L. M., SU, Y. J., FANG, B. H., SHEN, X. G., ZENG, Z. L., LIU, Y. H. (2007). Determination of Sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. ***Analytica Chimica Acta*** 594, 139-146.

HERRERO, M., GARCIA-CANAS, V., SIMO, C., CIFUENTES, A. (2010). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. ***Electrophoresis*** 31, 205-228.

HOU, X. L., LI, Y. G., WU, G. J., WANG, L., HONG, M., WU, Y. N. (2010). Determination of Para Red, Sudan Dyes, Canthaxanthin, and Astaxanthin in Animal Feeds Using UPLC. ***Journal of Chromatographic Science*** 48, 22-25.

LIU, S. F., ZHANG, X., LIN, X. C., WU, X. P., FU, F. F., XIE, Z. H. (2007). Development of a new method for analysis of Sudan dyes by pressurized CEC with amperometric detection. ***Electrophoresis*** 28, 1696-1703.

MEJIA, E., DING, Y. S., MORA, M. F., GARCIA, C. D. (2007). Determination of banned sudan dyes in chili powder by capillary electrophoresis. ***Food Chem.*** 102, 1027-1033.

MOLDER, K., KUNNAPAS, A., HERODES, K., LEITO, I. (2007). "Fast peaks" in chromatograms of Sudan dyes. ***Journal of Chromatography A*** 1160, 227-234.

MUIJSELAAR, P. G., OTSUKA, K., TERABE, S. (1998). On-line coupling of partial-filling micellar electrokinetic chromatography with mass spectrometry. ***J. Chromatogr. A*** 802, 3-15.

NIESSEN, W. M. A., TJADEN, U. R., VANDERGREEF, J. (1993). Capillary Electrophoresis Mass-Spectrometry. ***J. Chromatogr. A*** 636, 3-19.

NOGUEROL-CAL, R., LOPEZ-VILARINO, J. M., FERNANDEZ-MARTINEZ, G., BARRAL-LOSADA, L., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. V. (2008). High-performance liquid chromatography analysis of ten dyes for control of safety of commercial articles. ***Journal of Chromatography A*** 1179, 152-160.

PARDO, O., YUSA, V., LEON, N., PASTOR, A. (2009). Development of a method for the analysis of seven banned azo-dyes in chilli and hot chilli

food samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. ***Talanta*** 78, 178-186.

REBANE, R., LEITO, I., YURCHENKO, S., HERODES, K. (2010). A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes. ***J. Chromatogr. A*** 1217, 2747-2757.

UEMATSU, Y., OGIMOTO, M., KABASHIMA, J., SUZUKI, K., ITO, K. (2007). Fast cleanup method for the analysis of sudan I-IV and para red in various foods and paprika color (oleoresin) by high-performance liquid chromatography/diode array detection: Focus on removal of fat and oil as fatty acid methyl esters prepared by transesterification of acylglycerols. ***Journal of Aoac International*** 90, 437-445.

YU, C. H., LIU, Q., LAN, L. D., HU, B. (2008). Comparison of dual solvent-stir bars microextraction and U-shaped hollow fiber-liquid phase microextraction for the analysis of Sudan dyes in food samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet/mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A*** 1188, 124-131.

Súmula Curricular

Tatiana Shizue Fukuji

Dados Pessoais:

Nascimento: Londrina, 17 de maio de 1980.
Contato: tatianafukuji@gmail.com

Formação:

- Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina – PR (2003-2005).
- Graduação em Química, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina-PR (1998-2002).

Formação Complementar:

- Eletroforese capilar acoplada ao Espectrômetro de massas. 15º Simpósio Latino-americano de Eletroforese Capilar, 2009, Sevilla, Espanha.
- Aplicações de eletroforese Capilar e Microchip. 14º Simpósio Latino-americano de Eletroforese Capilar, 2008, Puerto Vallarta, México.
- Procedimentos para Implantação de Sistema APPCC. Universidade Estadual de Maringá, UEM, 2006, Maringá, PR.
- Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XX CBCTA, 2006, Campinas, SP.

Experiências profissionais:

- Laboratório Foodomics. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL, Madrid, Espanha. Doutorado sanduíche: Desenvolvimento da determinação de contaminantes da classe Sudan I-IV em alimentos por eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas (outubro de 2010 a fevereiro de 2011).
- Bolsista de doutorado CNPq (maio a setembro de 2007) e Fapesp (outubro de 2007 a março de 2011).

- Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR. Atuação como professora colaboradora de nível superior ministrando aulas de química geral e experimental para cursos de tecnologia em alimentos, tecnologia em meio ambiente e agronomia. Participação em projetos de pesquisa relacionada à área de ciência de alimentos (maio de 2005 a abril de 2007).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa-Soja. Atuação como estagiária em iniciação científica em projetos de pesquisa na área de fitopatologia e biologia molecular.

Publicações

- FUKUJI, T. S., CASTRO – PUYANA, M., TAVARES, M. F. M., CIFUENTES, A. Sensitive and fast determination of Sudan dyes in chilli powder by partial-filling micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* (Artigo aceito para publicação)

- FUKUJI, T. S., CASTRO – PUYANA, M., TAVARES, M. F. M., CIFUENTES, A. Fast Determination of Sudan Dyes in Chilli Tomato Sauces Using Partial Filling Micellar Electrokinetic Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 59, 11903-11909, 2011.

- FUKUJI, T. S., TONIN, F. G., TAVARES, M.F.M. Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits. *Journal of Pharmaceutical and* Biomedical *Analysis*, v. 51, 430-438, 2010.

- FUKUJI, T. S., FERREIRA, D. L., SOARES, A.L., PRETE, C.E.C., IDA, E.I. Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. *Acta Scientiarum. Technology,* v.30, p.31 - 35, 2008.

- DANESI, E. D. G., FUKUJI, T. S., ALVES, G. L., OLIVEIRA, R. C. G., LINO, M. C., PRAÇA, V. A. Avaliação da influência da casca no processamento de sucos. Acta Scientiarum. Technology, v.29, p.91 - 97, 2007.

- ALMEIDA, Á. M. R., SAKAI, J., SOUTO, E. R., KITAJIMA, E. W., FUKUJI, T. S., HANADA, K. Mosaic in Senna Occidentalis in Southern Brazil Induced by a new Strain of Soybean Mosaic Virus. Fitopatologia Brasileira. , v.27, p.151 - 153, 2001.