



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Giuliana Stael Nardini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS EMPREGANDO
HILIC-MS/MS**

Florianópolis
2019

Giuliana Stael Nardini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS EMPREGANDO
HILIC-MS/MS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Título de Mestre
em Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra

Nardini, Giuliana Stael
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS EMPREGANDO
HILIC-MS/MS / Giuliana Stael Nardini ; orientador, Luciano
Vitali, 2019.
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Cromatografia líquida . 3. HILIC-MS/MS. 4.
Ácidos orgânicos alifáticos. 5. Matrizes alimentícias. I.
Vitali, Luciano . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Giuliana Stael Nardini
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS EMPREGANDO
HILIC-MS/MS**

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

Prof.(a) Vanessa Simão, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina (CTA-UFSC)

Prof. Eduardo Sidinei Chaves, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-UFSC)

Prof. Daniel Lazaro Gallindo Borges, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestra em Química Analítica.

Prof. Marcus Mandolesi Sá, Dr.

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luciano Vitali, Dr.

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina (CFM-UFSC)

Florianópolis, 2019

*Este trabalho é dedicado à minha
querida mãe, Grace Stael de Lima
Nardini.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino de qualidade, ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realizar meu mestrado e ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luciano Vitali, pela oportunidade de trabalho, pela ótima orientação, pelos ensinamentos, atenção, disponibilidade e paciência durante todo este período e por ter me aceito em seu laboratório.

Aos professores Vanessa Simão, Eduardo Sidinei Chaves e Daniel Lazaro Gallindo Borges por terem aceito fazer parte da banca.

Aos meus pais, Grace e Roberto, minha irmã e sobrinho, Erica e Fernando, pelo amor incondicional, dedicação, paciência, carinho e apoio.

Agradeço de forma especial ao meu namorado Josias, pelo amor, carinho e por todos estes anos ao seu lado. Por ser essa pessoa incrível pela qual eu tenho enorme admiração. Agradeço também pela força, enorme ajuda durante o meu mestrado.

Aos colegas do LabEC pela ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho, em especial a Samantha, Victor, Mayara, Joana, Kheyti, Roberta, Carol, Riani, e ao prof. Dr. Gustavo Micke, por ter me aceito em seu laboratório.

Aos amigos que conheci durante o mestrado, em especial a Eduarda, Lucas Morés, Sangela, Leila e Felipe (agradeço por vocês terem resgatado e doado a minha querida Toninha).

Aos queridos amigos de muitos anos Renata Martins Pacheco, Daniel Linhares Bittencourt e Lara Martholly Di Martos.

Aos professores do Departamento de Química da UFSC, pelo conhecimento e pelo que contribuíram para minha formação acadêmica.

RESUMO

O presente trabalho propõe um método analítico para a determinação de 19 ácidos orgânicos alifáticos (acético, aminocapróico, ascórbico, aspártico, cetoglutárico, fumárico, glicólico, glucônico, glutâmico, glutárico, isobutírico, láctico, levulínico, maleico, málico, malônico, pirúvico, propiônico e succínico) em amostras alimentícias utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) com o modo de separação por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC). Foi realizada uma completa otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas dos analitos por monitoramento de reações múltiplas. As condições otimizadas de separação por HILIC envolveram a utilização de coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm, 100Å 150 x 4.6 mm e volume de injeção de 15 µL. A fase móvel ideal foi composta de acetonitrila e solução tampão formiato de amônio (8 mmol L⁻¹, pH 3) na proporção 75:25 (v/v) e usando um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Foi avaliado o desempenho analítico do método sendo determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os analitos, os quais variaram de 0,003 a 0,6 mg L⁻¹ e 0,009 a 2 mg L⁻¹, respectivamente. Os estudos de adição e recuperação realizados para as amostras de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte revelaram uma recuperação variando 40,69 a 159,41 %. Os valores de precisão obtidos para três níveis de concentração mostraram coeficientes de variação (CV) entre 0,67 a 2,82 % para tempo de retenção e 11,91 a 13,31 % para a maioria dos resultados de razão de áreas, com alguns valores chegando no máximo a 23,45 %. O método foi aplicado para a quantificação de ácidos orgânicos alifáticos em amostras de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte usando calibração por adição de padrão e preparo de amostra por simples diluição com água. A metodologia analítica proposta permitiu uma eficiente determinação dos 19 analitos em amostras com matrizes consideradas de alta complexidade.

Palavras-chave: ácidos orgânicos alifáticos; HILIC-MS/MS; matrizes alimentícias.

ABSTRACT

The present work proposes an analytical method for the determination of 19 aliphatic organic acids (acetic, aminocaproic, ascorbic, aspartic, ketoglutaric, fumaric, glycolic, gluconic, glutamic, glutaric, isobutyric, lactic, levulinic, maleic, malonic, malonic, pyruvic, propionic and succinic) in food samples using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS / MS) with the mode of separation by hydrophilic interaction chromatography (HILIC). A complete optimization of the parameters of the mass spectrometer was performed to monitor the analytes by monitoring multiple reactions. Optimized conditions for HILIC separation involved the use of SeQuant® ZIC®-HILIC column 3.5 μ m, 100Å 150 x 4.6 mm and injection volume of 15 μ L. The ideal mobile phase was composed of acetonitrile and ammonium formate buffer (8 mmol L⁻¹, pH 3) in the ratio 75:25 (v / v) and using a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The analytical performance of the method was determined and the limits of detection (LD) and quantification (LQ) were determined for the analytes, which varied from 0.003 – 0.6 mg L⁻¹ to 0.009 – 2 mg L⁻¹, respectively. The addition and recovery studies performed on the vinegar, wine, beer, orange juice and yogurt samples revealed a recovery ranging from 40.69 to 159.41 %. The precision values obtained for three concentration levels showed the coefficient of variation (CV) between 0.67 a 2.82 % for retention time and 11.91 a 13.31 % for most area ratio results, with some values reaching a maximum of 23.45 %. The method was applied for the quantification of aliphatic organic acids in samples of vinegar, wine, beer, orange juice and yogurt using calibration by addition of standard and sample preparation by simple dilution with water. The proposed analytical methodology allowed an efficient determination of the 19 analytes of interest in samples with matrices considered of high complexity.

Keywords: aliphatic organic acids; HILIC-MS/MS; food matrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contribuintes de ressonância para um ácido carboxílico e íon carboxilato.	27
Figura 2. HILIC combina as características das três maiores abordagens em cromatografia líquida.....	32
Figura 3. Representação do mecanismo de separação em HILIC.	37
Figura 4. Processo de formação do electrospray conduzidos para o espectrômetro de massa pelo campo elétrico aplicado.....	39
Figura 5. Esquema de um analisador de massas do tipo triploquadropolo MS/MS.	41
Figura 6. a) curva de calibração clássica b) gráfico da razão área/concentração vs. Concentração em escala logarítmica.....	44
Figura 7. Parâmetros otimizado no espectrômetro de massas do ácido acético (a) Potencial de desagregação (DP), (b) Potencial de entrada (EP), (c) Energia de colisão (CE), (d) Potencial de entrada na célula de colisão (CEP), (e) Potencial da célula de saída (CXP), (f) Espectro resultante. Condições experimentais vide seção 5.3.	61
Figura 8. Superfície de resposta obtida através do planejamento Doehlert. Mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L ⁻¹ na coluna (2), temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de 10 µL e fase móvel acetonitrila: solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).	68
Figura 9. Gráfico obtido com estudo do efeito da concentração de sal formiato de amônio na fase móvel aquosa. O gráfico mostra número de pratos versus concentração de sal adicionada. Condições experimentais: mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L ⁻¹ na coluna (2), temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de 10 µL e fase móvel acetonitrila: solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).....	69
Figura 10. Gráficos plotados com os resultados obtidos no estudo de volume de injeção. Gráfico a) média geométrica das áreas dos sinais pelo volume de injeção, b) média geométrica das alturas dos sinais pelo volume de injeção e c) média das larguras dos sinais pelo volume de injeção.	71
Figura 11. Sinais correspondentes da fragmentação do ácido malônico. a) Sinal do ácido malônico após extração dos íons, b) Sinais dos fragmentos separados para ácido malônico..	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência dos ácidos orgânicos em diversas matrizes alimentícias.	23
Tabela 2. Informações importantes características dos ácidos orgânicos alifáticos utilizados neste trabalho.	27
Tabela 3. Metodologias para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em alimentos de acordo com a literatura	30
Tabela 4. Diferentes fases estacionárias utilizadas em HILIC.	34
Tabela 5. Experimentos realizados no planejamento <i>Doehlert</i> , para a escolha da melhor proporção da fase móvel e pH do tampão da fase aquosa.	56
Tabela 6. Concentração de formiato de amônio (NH ₄ COOH) adicionado para o estudo do efeito da variação da concentração das soluções tampão preparadas, e os respectivos pH obtidos com auxílio de pHmetro.	57
Tabela 7. Informações de cada composto ácido orgânico analisado no LC-MS/MS (modo negativo). A agulha capilar foi mantida a -4500V. Parâmetros do MS/MS: gás de cortina 10 psi; temperatura da fonte 350 °C; gás nebulizador 1,45 psi; gás de secagem 2,45 psi; gás da dissociação induzida por colisão médio. Compostos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de múltiplas reações (MRM). Otimização do espectrômetro de massas foi feito através das infusões diretas de soluções aquosas contendo os analitos investigados.....	63
Tabela 8. Resultados das colunas testadas. Avaliação realizada com uma mistura dos ácidos orgânicos em concentração 2 mg L ⁻¹ para colunas (1) e (2), 5 mgL ⁻¹ para coluna (3), composição da fase móvel: 60% de acetonitrila e 40% de água ultrapura, fluxo de 500 µL min ⁻¹ para as colunas (1) e (2), 100 µL min ⁻¹ para coluna (3), temperatura das colunas a 30 °C, e volume de injeção de 10 µL para as colunas (1) e (2), 5µL para coluna (3)	66
Tabela 9. Comparação entre concentração de sal formiato de amônio adicionada e tempo de eluição do último analito. Condições experimentais: mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L ⁻¹ na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm,100Å 150 x 4.6 mm, temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de 10 µL e fase móvel acetonitrila e solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).	70
Tabela 10. Tempos de retenção para os ácidos orgânicos utilizados. Mistura dos ácidos orgânicos em concentração 2 mg L ⁻¹ na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm,100Å 150 x 4.6 mm. Fase móvel acetonitrila e solução tampão formiato de amônio 8 mmol L ⁻¹ pH 3 (75:25 v/v). Fluxo da fase móvel 500 µL min ⁻¹ , volume de injeção 15 µL e temperatura da coluna 30 °C.	72

Tabela 11. Parâmetros analíticos das curvas de calibração por padronização interna.....	77
Tabela 12. Equações das curvas de calibração por padronização interna e por adição de padrão obtidas nas diferentes matrizes alimentícias e em diferentes diluições.	81
Tabela 13. Percentual de recuperação para o método desenvolvido, avaliado em três níveis de concentração, com cinco diferentes matrizes, fortificadas com mistura dos padrões de ácidos orgânicos.	86
Tabela 14. Valores de precisão intra e inter-ensaio para o método desenvolvido, avaliado em três níveis de concentração, utilizando mistura dos padrões de ácidos orgânicos.....	89
Tabela 15. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinagre de cana-de-açúcar 1	91
Tabela 16. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinagre de cana-de-açúcar 2.	91
Tabela 17. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de maçã 1.	92
Tabela 18. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de maçã 2.	92
Tabela 19. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de mel.....	92
Tabela 20. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre balsâmico.	92
Tabela 21. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinho.....	94
Tabela 22. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de cerveja....	95
Tabela 23. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de suco de laranja.....	95
Tabela 24. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de iogurte....	96

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C8 – Fase estacionária octil

C18 – Fase estacionária octadecil

CAD – Dissociação ativada por colisão (do inglês, *collisionally activated dissociation*)

CE – Energia de colisão (do inglês, *collision energy*)

CEP – Potencial de entrada na célula de colisão (do inglês, *collision cell entrance potential*)

CF – Ciclofrutano

CF6-P – Ciclofrutano com seis unidades de D-frutofuranose

CAD – Dissociação induzida por colisão, (do inglês, *collisionally activated dissociation*)

CL – Detector de quimiluminescência (do inglês, *chemiluminescence*)

CV – Coeficiente de variação

CXP – Potencial da célula de saída (do inglês, *collision cell exit potential*)

DAD – Detector de arranjo de diodos (do inglês, *diodearray detector*)

DP – Potencial de desagregação (do inglês, *declustering potential*)

DPR – Desvio padrão relativo

ED – Detector eletroquímico (do inglês, *electrochemical detector*)

EP – Potencial de entrada (do inglês, *entrance potential*)

ESI – Ionização por electrospray (do inglês, *electrospray ionization*)

FAO – Organização para alimentação e agricultura (do inglês, *food agriculturaçl organization*)

FID – Detector de ionização em chama (do inglês, *flame ionization detector*)

GC – Cromatografia gasosa (do inglês, *gas chromatography*)

HILIC – Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

HS PEG – Fase estacionária de polietilenoglicol/ sílica

LD – Limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)

LQ – Limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification*)

IC – Cromatografia iônica (do inglês, *ion chromatography*)

IC – Intervalo de confiança

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental

k' – Fator de retenção

LARIHC-P – Coluna cromatográfica comercial a base do derivado isopropílico de ciclofrutano-6

LGC – Laboratório químico do governo (do inglês, *laboratory of the government chemist*)

MRM – Monitoramento de reação múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

MS – Espectrômetro de massa (do inglês, *mass spectrometry*)

m/z – Razão massa/ carga

NIST – Instituto Nacional de padrões e tecnologia (do inglês, *national institute of standards and technology*)

NP-LC – Cromatografia líquida de fase normal (do inglês, *normal phase liquid chromatography*)

OMS – Organização mundial da saúde

PDA – Detector de arranjo de diodos (do inglês, *photodiodearray detector*)

PVDF – *Poly (vinylidene difluoride)*

RID – Detector de índice de refração (do inglês, *refractive index detector*)

RP-LC – Cromatografia líquida de fase reversa (do inglês, *reversed phase liquid chromatography*)

TOF – Analisador de massa de tempo de voo (do inglês, *time of flight*)

USP – Farmacopéia dos Estados Unidos (do inglês, *United States Pharmacopea*)

UV/Vis – Ultravioleta/ visível (do inglês, *ultraviolet/ visible*)

ZIC-HILIC – Colunas cromatográficas baseadas em fases ligadas por sulfoalquil betaínazwitterionica

SUMÁRIO

ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS: OCORRÊNCIA NATURAL E PRESENÇA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS.....	21
2.1.1 Características químicas dos ácidos orgânicos alifáticos.....	26
2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS.....	29
2.3 MODOS DE SEPARAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	31
2.3.1 Fases estacionárias para HILIC.....	33
2.3.2 Escolha da fase móvel em HILIC	35
2.3.3 Mecanismo de separação no modo HILIC	36
2.4 SISTEMA DE DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	38
2.4.1.1 <i>Ionização pelo processo electrospray</i>	39
2.4.1.2 <i>Analísadores de massa triplo Quadrupolo</i>	40
3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	41
3.1 SELETIVIDADE.....	42
3.2 LINEARIDADE	43
3.2.1 Padronização externa	45
3.2.2 Padronização interna	45
3.2.3 Simulação de matriz	45
3.2.4 Adição de padrão	46
3.3 PRECISÃO.....	46
3.3.1 Repetibilidade	47
3.3.2 Precisão intermediária	48
3.3.3 Reprodutibilidade.....	48
3.4 EXATIDÃO.....	48
3.4.1 Materiais de referência certificados.....	49

3.4.2 Comparação com o método de referência.....	49
3.4.3 Ensaios de recuperação	49
3.5 LIMITE DE DETECÇÃO	50
3.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	51
4 OBJETIVOS.....	52
4.1 OBJETIVO GERAL.....	52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
5 MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	53
5.2 INSTRUMENTAÇÃO LC-MS/MS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO OTIMIZADO.....	53
5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	54
5.4 OTIMIZAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	54
5.4.1 Seleção da coluna	54
5.4.2 Composição da fase móvel.....	55
5.4.3 Proporção de solvente orgânico e pH.....	55
5.4.4 Efeito da concentração de sais na fase móvel	56
5.4.5 Avaliação do volume de injeção	57
5.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO	57
5.5.1 Linearidade.....	58
5.5.2 Ensaios de adição e recuperação.....	58
5.5.3 Ensaios de precisão	59
5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO	59
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	60
6.1.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para obtenção dos íons precursores e quantitativos dos analitos	60
6.1.2 Seleção da coluna cromatográfica	64
6.1.3 Otimização da proporção de fase móvel	66
6.1.4 Efeito da concentração de sais como aditivos na fase móvel.....	68
6.1.5 Estudo do volume de injeção.....	70
6.1.6 Seleção do padrão interno para o método	72

6.2 PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO.....	73
6.2.1 Seletividade	73
6.2.2 Linearidade	75
6.2.2.1 <i>Calibração por padronização interna.....</i>	75
6.2.2.2 <i>Calibração por adição de padrão usando padrão interno</i>	80
6.3 EXATIDÃO.....	85
6.4 PRECISÃO.....	89
7 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	91
7.1 VINAGRE.....	91
7.2 VINHO.....	94
7.3 CERVEJA.....	94
7.4 SUCO DE LARANJA	95
7.5 IOGURTE.....	96
7.6 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DA LITERATURA....	97
8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	99
APÊNDICE A	101
APÊNDICE B.....	103
APÊNDICE C.....	106
9 REFERÊNCIAS	111

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos orgânicos alifáticos são os ácidos mais comuns com os quais convivemos no cotidiano, eles estão presentes naturalmente em diversos alimentos e existe uma grande variedade destes compostos na natureza. Além de estarem presentes nas frutas e verduras, eles são formados a partir de processos fermentativos, então à medida que a fruta vai amadurecendo, por exemplo, ou um queijo vai ficando rançoso, a quantidade de ácidos orgânicos aumenta. Outro fator, é que os ácidos orgânicos também são usados como aditivos na indústria alimentícia, pois como eles apresentam propriedades ácidas, podem ser utilizados como acidulantes, conservantes, reguladores de acidez, antifúngicos, entre outras utilidades. Para se realizar a caracterização, monitoramento e controle de qualidade dos alimentos, é necessário que existam métodos analíticos que possibilitem a determinação destes ácidos orgânicos.

Na literatura, diferentes técnicas instrumentais estão reportadas para determinação dos ácidos orgânicos alifáticos, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. De forma geral, equipamentos de HPLC são utilizados para esta finalidade, sendo que diversos tipos de sistema de detecção podem ser utilizados como detectores baseados em arranjo de diodos, ultravioleta/ visível, índice de refração, entre outros. Este sistema permite realizar a separação, identificação e quantificação de analitos em misturas complexas englobando espécies em uma grande variedade de amostras orgânicas, inorgânicas e biológicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O modo de separação amplamente utilizado em HPLC é a cromatografia reversa, na qual se utiliza uma fase estacionária menos polar que a fase móvel e a retenção dos analitos aumenta quando a polaridade da fase móvel aumenta, sendo assim analitos não polares ficam mais retido do que analitos polares. As colunas C8 e C18 são amplamente utilizadas devido a sua versatilidade. É possível analisar ácidos orgânicos por fase reversa devido a presença das cadeias carbônicas nestes compostos, no entanto, a separação deles é dificultada uma vez que os ácidos orgânicos mais comuns apresentam de 2 a 4 carbonos, e com isso apresentam pouca retenção nas colunas apolares, desta forma os analitos muitas vezes saem da coluna no tempo morto. Neste caso, devem ser utilizados diferentes aditivos, gradientes na fase móvel para contornar este problema.

Uma alternativa aos modos de separação convencionais, que vem sendo muito estudada nos últimos anos é a cromatografia de interação hidrofílica. Na separação HILIC são utilizadas fases estacionárias polares e as fases móveis devem apresentar de 60 a 95 % de solvente

orgânico e o restante de água ultrapura (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). A fase estacionária polar possibilita análise satisfatória de compostos polares de forma muito mais eficiente que os outros tipos de separação conhecidos.

Após a realizar uma eficiente separação dos analitos, deve-se garantir a que o sistema de detecção utilizado seja poderoso para detectar e quantificar os ácidos orgânicos. Como comentado anteriormente, diversos detectores podem ser eficientemente utilizados. Um sistema de detecção baseado em espectrometria de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo, é uma poderosa técnica que proporciona alta seletividade à análise, pois os analitos são detectados através do monitoramento de reações múltiplas, ou seja, são monitorados através de valores de razão massa/carga selecionados especificamente para cada analito.

O acoplamento da técnica de separação HILIC ao sistema de detecção por espectrometria MS/MS possibilitou o desenvolvimento de um método analítico por HILIC-MS/MS para determinação de 19 ácidos orgânicos (acético, aminocapróico, ascórbico, aspártico, cetoglutárico, fumárico, glicólico, glutárico, isobutírico, láctico, levulínico, maleico, málico, malônico, pirúvico, propiônico e succínico). O método desenvolvido foi avaliado baseando-se em normas vigentes de legislações brasileiras e internacionais em função dos parâmetros de mérito linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. O método foi aplicado em 5 amostras de alimentos complexas (vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte). O preparo de amostras consistiu em apenas diluição e as quantidades de ácidos orgânicos foram determinadas por calibração por adição de padrão e foi utilizado padrão interno ácido mucônico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS: OCORRÊNCIA NATURAL E PRESENÇA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

Os ácidos orgânicos alifáticos estão muito presentes no cotidiano, em diversas matrizes alimentícias como frutas, verduras, bebidas etc. Alguns exemplos da ocorrência natural dos ácidos orgânicos incluem o ácido fórmico o qual é o responsável pelo ardor das picadas de formiga, sendo esse o mais simples dos ácidos carboxílicos (ácido propanoico). O ácido acético, principal componente do vinagre, é usado como condimento e conservante de alimentos. O ácido cítrico é fabricado a partir da fermentação aeróbica do açúcar pelo microorganismo *Aspergillus Niger*, este ácido é também o responsável pela acidez das frutas cítricas. Seu maior uso é como acidulante de bebidas e é empregado em sais efervescentes para combater os sintomas da azia. O ácido oxálico é um ácido dicarboxílico presente em plantas como espinafre e azedinhas. É um bom removedor de manchas e ferrugem, sendo usado em soluções comerciais de limpeza. Além disso, o sal oxalato de cálcio monohidratado derivado deste ácido é constituinte dos cálculos renais (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

O ácido propiônico é responsável pelo cheiro característico do queijo suíço. Na maturação do queijo a *Propionibacterium Shermanii* e microorganismos similares convertem ácido láctico e lactatos em ácido propiônico, acético e a dióxido de carbono. A geração de CO₂ é responsável pela formação dos “buracos” do queijo suíço. O ácido butírico fornece um odor peculiar a rancidez da manteiga e é usado na síntese de aromas, em fármacos e em agentes emulsificantes. O ácido láctico é produzido através da oxidação da lactose pelo *Streptococcus lactis*. Na indústria ele é empregado na neutralização de cal, no curtimento de couros, e como acidulante de alimentos industrializados. O ácido láctico também é produzido no corpo humano, quando a glicose é metabolizada pela atividade muscular anaeróbica. O ácido sórbico é encontrado em plantas, utilizada como fungicida, conservante de alimentos e na fabricação de plásticos e lubrificantes. O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C tem este nome devido seu valor biológico na proteção contra a doença escorbuto, do Latim *scorbutus* (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

Foi realizada uma pesquisa na literatura para verificar quais ácidos orgânicos alifáticos estão presentes em diferentes alimentos e com estas informações foi feita a Tabela 1. Na primeira página da tabela constam os ácidos orgânicos (acético, ascórbico, butírico, cetoglutárico, cítrico, fórmico, glucônico e glutâmico) presentes nas matrizes alface, alimentos

fermentados, banana, café fresco, cerveja, chá de camomila, laranja e maçã, e as respectivas referências. Na segunda página da tabela, constam os mesmos ácidos orgânicos presentes nas matrizes mel, melão, pêssego, pimentão, saquê, uva, vinagre e vinho e as respectivas referências. E por fim, na terceira página da tabela, constam os demais ácidos orgânicos (lático, levulínico, maleico, málico, malônico, oxálico, pirúvico, propiônico, succínico e tartárico) em todas as matrizes alimentícias citadas anteriormente.

Tabela 1. Ocorrência dos ácidos orgânicos em diversas matrizes alimentícias.

	Acético	Ascórbico	Butírico	Cetoglutárico	Cítrico	Fórmico	Fumárico	Glucônico	Glutâmico	Referências
Alface				✓	✓		✓		✓	(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
Fermentados	✓					✓				(LEROY; VUYST, 2004)
Banana		✓			✓					(ANYASI; JIDEANI; MCHAU, 2015)
Café fresco	✓				✓	✓				(RODRIGUES et al., 2007)
Cerveja	✓				✓					(RODRIGUES et al., 2010)
Camomila					✓		✓			(GUIMARÃES et al., 2013)
Laranja		✓		✓	✓				✓	(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
										(SCHERER et al., 2012)
Maçã		✓			✓					(SCHERER et al., 2012)

Tabela 1. (continuação)

	Acético	Ascórbico	Butírico	Cetoglutárico	Cítrico	Fórmico	Fumárico	Glucônico	Glutâmico	Referências
Mel	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		(MATO et al., 2003)
Melão					✓		✓		✓	(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
Pêssego				✓	✓		✓	✓	✓	(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
Pimentão				✓	✓		✓		✓	(SANDÍN-ESPAÑA et al., 2016)
Saquê	✓									(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
Uva				✓	✓		✓		✓	(OHIRA et al., 2014)
Vinagre	✓				✓	✓				(NAVARRO-PASCUAL-AHUIR et al., 2015)
Vinho					✓					(ZHANG et al., 2011)
										(OHIRA et al., 2014)
										(ZHANG et al., 2011)

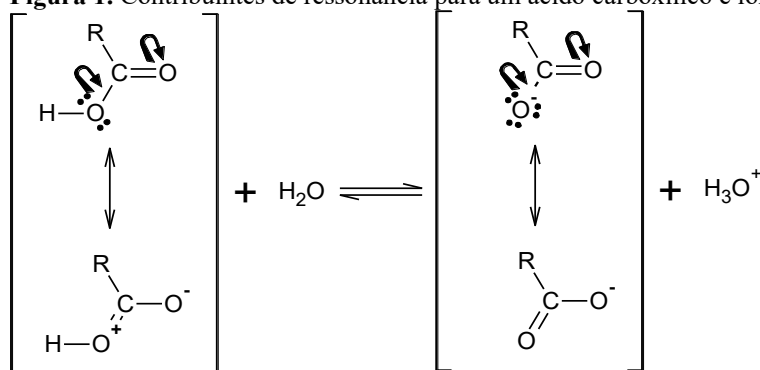
De acordo com esta tabela, o mel é o alimento que mais se destaca, e depois tem-se o pêssego, alface, pimentão verde e pimentão vermelho, laranja, tomate e vinho que são alimentos muito ricos em diversidade de ácidos orgânicos. Os alimentos com menos ácidos orgânicos são a banana, suco de abacaxi, suco de maçã, suco de tangerina e suco de uva. Mas de forma geral, a maioria dos alimentos apresenta pelo menos três ácidos orgânicos diferentes.

Além de estar presente naturalmente em alimentos, os ácidos orgânicos são amplamente utilizados na indústria alimentícia como aditivos, devido às suas propriedades físico químicas. Esses compostos são adicionados para controlar a alcalinidade de muitos produtos, agindo então como tampões ou como agentes neutralizantes. Podem ser usados também como conservantes, agindo como antimicrobianos ou antioxidantes (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

O emprego de aditivos alimentares é limitado por normas específicas fundamentadas em critérios restritos baseados em regulamentações emitidas por especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização para alimentação e agricultura (FAO), uma vez que a principal preocupação sobre o uso de aditivos é o risco toxicológico que estes produtos podem acarretar dependendo da quantidade ingerida.

2.1.1 Características químicas dos ácidos orgânicos alifáticos

Os ácidos orgânicos mais comuns são os ácidos carboxílicos – substâncias que apresentam um grupamento COOH. A estabilidade das bases conjugadas é atribuída, primeiro devido ao íon carboxilato ter um átomo de oxigênio duplamente ligado em vez de dois hidrogênios como no íon alcóxido (CARROLL, 2010). A retirada de elétrons pelo átomo de oxigênio eletronegativo estabiliza o íon pela diminuição da densidade eletrônica do oxigênio carregado negativamente (CARROLL, 2010). Outro fator é que o íon carboxilato possui energia de ressonância maior que um ácido carboxílico, pois o íon apresenta dois contribuintes de ressonância enquanto o ácido carboxílico apresenta somente um, como mostrado na Figura 1.

Figura 1. Contribuintes de ressonância para um ácido carboxílico e íon carboxilato.

Fonte: Adaptado de Carroll (2010).

Os ácidos orgânicos são amplamente encontrados na natureza, eles influenciam significativamente as propriedades organolépticas de frutas e vegetais particularmente no que diz respeito ao sabor, cor e aroma. São responsáveis pelo sabor azedo nas frutas o que é usualmente utilizado para classificar as características cítricas das mesmas (KADER, 2008). Além disso, os ácidos orgânicos afetam indiretamente o metabolismo fenólico alterando o pH e atuam como precursores de compostos fenólicos e aromatizantes (GÁLDON et al., 2008).

Na Tabela 2, encontram-se informações relevantes a respeito das características físicas dos ácidos orgânicos estudados neste trabalho, sendo elas a estrutura, fórmula molecular, massa molecular, pKa e log P.

Tabela 2. Informações importantes características dos ácidos orgânicos alifáticos utilizados neste trabalho.

Ácido	Estrutura	Fórmula molecular	Massa molar / g mol ⁻¹	pK _a *	log P	Número CAS	Referência
<u>α-cetoglutárico</u>		C ₅ H ₆ O ₅	146,10	2,47 4,68	-	328-50-7	-
<u>Acético</u>		C ₂ H ₄ O ₂	60,05	4,76	-0,17	64-19-7	(SANGSTER, 1989)
<u>Aminocapróico</u>		C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	4,37 10,80	-2,95	60-32-2	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
<u>Ascórbico</u>		C ₆ H ₈ O ₆	176,12	4,04 11,7**	-1,85	50-81-7	(AVDEEF, 1997)

*a 25 °C; **a 16 °C.

Tabela 2. (continuação)

Ácido	Estrutura	Fórmula molecular	Massa molar / g mol ⁻¹	pK _a *	log P	Número CAS	Referência
Aspártico		C ₄ H ₇ NO ₄	133,10	1,99 3,90 9,90	-3,89	56-84-8	(CHMELÍK et al., 1991)
Cítrico		C ₆ H ₈ O ₇	192,12	3,13 4,76 6,40	-1,64	77-92-9	(AVDEEF, 1997)
Glicólico		C ₂ H ₄ O ₃	76,05	3,83	-1,11	79-14-1	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Glucônico		C ₆ H ₁₂ O ₇	196,16	3,39	-	526-95-4	-
Glutâmico		C ₅ H ₉ NO ₄	147,13	2,13 4,31 9,67	-3,69	56-86-0	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Glutárico		C ₅ H ₈ O ₄	132,12	4,32** 5,42	-0,29	110-94-1	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Isobutírico		C ₄ H ₈ O ₂	88,11	4,84***	0,94	79-31-2	(SANGSTER, 1989)
Lático		C ₃ H ₆ O ₃	90,08	4,32	-0,72	50-21-5	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Levulínico		C ₅ H ₈ O ₃	116,07	4,32	-0,49	123-76-2	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Fumárico		C ₄ H ₄ O ₄	116,07	3,02 4,38	0,46	110-17-8	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Maleico		C ₄ H ₄ O ₄	116,07	1,92 6,23	-0,48	110-16-7	(SANGSTER, 1989)
Málico		C ₄ H ₆ O ₅	134,09	3,40 5,11	-1,26	6915-15-7	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Malônico		C ₃ H ₄ O ₄	104,06	2,85 5,70	-0,81	141-82-2	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)
Pirúvico		C ₃ H ₄ O ₃	88,06	2,39	-	127-17-3	-
Propiônico		C ₃ H ₆ O ₂	74,08	4,87	0,33	79-09-4	(SANGSTER, 1989)
Succínico		C ₄ H ₆ O ₄	118,09	4,21 5,64	-0,59	110-15-6	(HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995)

* a 25 °C; ** a 18 °C; *** a 20 °C. Fonte: Autora.

Através desta tabela pode-se observar que os ácidos orgânicos utilizados neste trabalho apresentam no máximo 6 carbonos, sendo que a menor substância é o ácido acético, massa molecular 60 g mol^{-1} , e a maior massa molecular é do ácido glucônico, de 196 g mol^{-1} . As estruturas encontradas nesta tabela estão representadas na forma plana, devido a isso não é possível diferenciar os ácidos fumárico e maleico pois eles apresentam a mesma representação, por serem isômeros.

Foi consultado o *Handbook of Chemistry and Physics*, edição 91 (HAYNES, 2010-2011), para preencher os valores pK_a . Através da Tabela 2, nota-se que os valores de pK_a variam de 1,92, para a primeira dissociação do ácido maleico a 9,90 para a ionização do grupo amino presente no ácido aspártico.

O $\log P$ é o logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água (P), este coeficiente informa a tendência de uma substância se distribuir entre as fases formadas por 1-octanol e água. Se $\log P$ for menor do que zero, então P é menor do que 1 e a tendência da substância é de se dissolver na fase aquosa, sendo assim uma substância hidrofílica. No *Handbook of Chemistry and Physics* não estão listados valores de $\log P$ para a maioria dos ácidos orgânicos, por isso foi necessário encontrar estes dados em outros trabalhos científicos, na Tabela 2 constam as referências utilizadas para esta finalidade. Em relação aos dados de $\log P$ dos ácidos orgânicos listados, pode-se notar que a maioria apresenta valores negativos, indicando que são compostos hidrofílicos. Sendo assim, os analitos utilizados neste trabalho apresentam características de compostos polares.

2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS

Vários métodos envolvendo diferentes técnicas analíticas e modos de separação foram desenvolvidos para identificar e quantificar os ácidos orgânicos individualmente em diferentes matrizes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. Na Tabela 3 estão listados alguns métodos relevantes encontrados na literatura, incluindo equipamento, coluna cromatográfica, número de analitos quantificados, limites de detecção, recuperação e as respectivas referências.

Tabela 3. Metodologias para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em alimentos de acordo com a literatura

Equipamento	Separação	Ácidos orgânicos alifáticos	Tipo de amostra / Preparo	Limites de detecção (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
HPLC-MS	RP-LC Coluna C18	11	Frutas e vegetais/cartuchos de SPE e diluição	0,01 a 15,16 mg/ 100 g*	73 - 119	(FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012)
HPLC-MS/MS	Modo HILIC	5	Urina / diluição e filtração	0,5 - 2	89,1 – 104,3	(HUANG et al., 2012)
HPLC-UV/Vis	RP-LC Coluna C18	7	Café verde/ SPE	0,4 – 30	24 - 122	(RODRIGUES et al., 2007)
CE-UV/Vis		6	Cerveja/ diluição e filtração	-	-	(RODRIGUES et al., 2010)
UFLC-PDA	RP-LC Coluna C18	8	Cogumelos/ extração e filtração	0,08 – 36	91 – 99	(BARROS; PEREIRA; FERREIRA, 2013)
HPLC-DAD	RP-LC Coluna C18	4	Frutas e sucos/ diluição e filtração	0,01 – 0,8	95 – 100	(SCHERER et al., 2012)
HPLC-UV/Vis	Coluna de exclusão iônica	3	Uva e suco de uva/ Filtração e precipitação	15 – 30	86,2 – 104,9	(SOYER; KOCA; KARADENIZ, 2003)
HPLC-RID	Coluna de troca iônica	2	Biomassa/ digestão, separação sólido-líquido	500 – 1000	105 – 114	(SCARLATA; HYMAN, 2010)
CE-UV/Vis		5	Vinho/ diluição e filtração	0,015 – 0,054	98 – 107	(CASTIÑEIRA et al., 2002)
HPLC-CL	RP-LC Coluna C18	5	Diversas bebidas/ filtração e diluição	50 fmol**	98,8 – 101,6	(PÉREZ-RUIZ et al., 2004)
HPLC-ED	Coluna de troca iônica	6	Vinho/ diluição	6 – 21 ng***	92 – 101	(KOTANI et al., 2004)
GC-FID	Coluna DB	8	Café/ derivatização	-	85 – 99,3	(JHAM et al., 2002)
HPLC-UV/Vis	Coluna troca iônica	8	Café/ extração com água	-	97 – 100	(JHAM et al., 2002)
GC-MS	Coluna MDN-5S	5	Vinho e vinagre/ derivatização e extração	-	86,2 – 99,8	(GIUMANINI et al., 2001)

*Os resultados foram expressos em g por 100 g do peso seco.; **Os limites foram expressos em fmol por 20 µL de volume de injeção; ***Os limites foram expressos em massa porque as áreas dos picos de cada ácido foram linearmente relacionadas com a quantidade em massa de ácido injetado. Fonte: Autora

De acordo com a Tabela 3, foram utilizados para análise de ácidos orgânicos mas a maioria dos métodos utiliza HPLC com sistemas de detecção diversos como por exemplo MS, UV e DAD. Entre todos esses métodos, os que são baseados em GC e LC acoplados a detectores de massas são considerados os métodos mais sensíveis e seletivos para análise de ácidos orgânicos. No entanto, os métodos por GC são mais tediosos, pois alguns dos ácidos orgânicos não é volátil e é necessária uma etapa de derivatização (GIUMANINI et al., 2001). Em virtude disso, métodos por LC-MS são mais indicados para determinação de diversos ácidos orgânicos em uma mesma corrida cromatográfica. Em relação aos modos de separação, fase reversa e troca iônica são as técnicas mais difundidas, sendo que poucos trabalhos na literatura reportam utilização de outros modos de separação. No entanto, é de grande interesse científico que alternativas a estas formas convencionais de separar analitos sejam exploradas.

2.3 MODOS DE SEPARAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Existem diversas abordagens para cromatografia líquida, dois tipos com grande notoriedade são a cromatografia líquida de fase normal (NP-LC) e a cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC). Na NP-LC, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e a retenção aumenta à medida que a polaridade da fase móvel diminui, fazendo com que os analitos polares fiquem mais fortemente retidos do que os não-polares. Na RP-LC ocorre a situação oposta, a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel, e a retenção aumenta quando a polaridade da fase móvel aumenta, e desta forma os analitos não-polares ficam mais retidos do que os polares. Atualmente, a RP-LC é o modo de separação mais utilizado devido a versatilidade das colunas C8 e C18 (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) é um modo alternativo de cromatografia líquida de alta eficiência para separar eficientemente pequenos compostos polares em fases estacionárias polares (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). O acrônimo HILIC foi primeiramente sugerido por Alpert em 1990 como uma técnica de separação de moléculas polares como peptídeos, carboidratos e ácidos nucleicos empregando uma fase estacionária pouco polar com uma fase móvel composta por uma mistura de solventes orgânicos e água (ALPERT, 1990).

Por razões históricas, acredita-se que a HILIC é uma variante da NP-LC devido ao fato de ambas empregarem fases estacionárias polares como sílica, amino ou ciano (OYLER et al., 1996); (GARBIŠ et al., 2001); (OLSEN, 2001); (LI; HUANG, 2004); (GUO; GAIKI, 2005),

no entanto, a fase móvel utilizada é similar àquelas empregadas em RP-LC (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006); (LI; HUANG, 2004); (GUO; GAIKI, 2005).

Figura 2. HILIC combina as características das três maiores abordagens em cromatografia líquida.



Fonte: Adaptado de Buszewski e Noga (2012).

A Figura 2 mostra como a HILIC complementa outras áreas de cromatografia e amplia a gama de opções de separação. Esta técnica apresenta o mesmo adsorvente utilizado em fase normal, isto é, fases estacionárias polares. Utiliza os mesmos eluentes daqueles presentes na fase reversa, como acetonitrila, metanol, água ultrapura e soluções tampão, e a HILIC também permite a análise de substâncias carregadas assim como na cromatografia iônica. Desta forma, a HILIC apresenta muitas vantagens em relação a NP-LC e RP-LC convencionais, pois é adequado para analisar compostos em sistemas complexos que sempre eluem perto do tempo morto da coluna de fase reversa. As amostras polares mostram sempre boa solubilidade na fase móvel aquosa usada em HILIC, que supera os inconvenientes da fraca solubilidade frequentemente encontrada em NP-LC. Podem ser convenientemente acoplados à espectrometria de massa (MS), especialmente no modo de ionização por electrospray (ESI). Em contraste com RP-LC, a eluição por gradiente em HILIC começa com um solvente orgânico de baixa polaridade e elui os analitos polares aumentando a fase móvel aquosa.

A cromatografia líquida por interação hidrofílica estabeleceu-se como o modo de separação de escolha para produtos altamente hidrofílicos e anfifílicos não carregados que são muito polares para serem bem retidos em RP-LC, mas têm carga insuficiente para permitir retenção eletrostática efetiva em cromatografia de troca iônica. A separação HILIC atualmente está atraindo muito interesse, já que resolve muitos problemas de separação anteriormente difíceis, como separação de pequenos ácidos orgânicos, medicamentos básicos e muitas outras substâncias neutras e carregadas (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

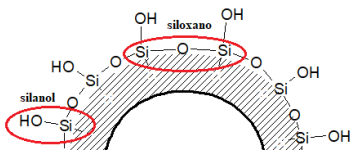
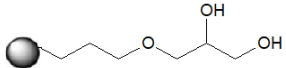
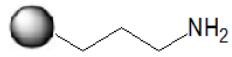
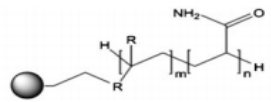
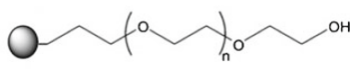
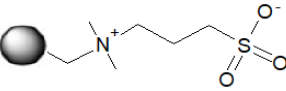
2.3.1 Fases estacionárias para HILIC

Qualquer superfície cromatográfica polar pode ser usada para separação em HILIC. Uma fase estacionária HILIC típica consiste em sílica pura clássica ou sílica gel modificada com muitos grupos funcionais. Fases estacionárias baseadas em polímeros também podem ser utilizadas (BUSZEWSKI e NOGA, 2012).

A primeira geração do modo de separação HILIC começou em 1975, com a separação de carboidratos por uma fase estacionária de amino-sílica, Bondapak (Waters, Milford, MA, USA) e acetonitrila e água (75:25 v/v) foram utilizadas como fase móvel (LINDEN; LAWHEAD, 1975). A próxima geração de fase estacionária para HILIC foi aplicação de diol e amida-sílica. A coluna de diol-sílica tem sido mais usada para separação de proteínas (REGNIER; NOEL, 1976); (RUBINSTEIN, 1979).

Nos últimos 15 anos, a HILIC progrediu para implementações de segunda e terceira geração, a maioria envolvendo fases sólidas de interação mista ou de múltiplas interações, as colunas HILIC mais tradicionais e as mais sofisticadas. Novos materiais de separação para HILIC foram surgindo e atraíram atenção (STREGE; STEVENSON; LAWRENCE, 2000); (STREGE, 1998); (IWASAKI et al., 2006); (OERTEL; NEUMEISTERB; KIRCH, 2004); (HORIE et al., 2007). Desta forma, é possível obter mais variações estruturais das fases estacionárias do tipo HILIC do que as encontradas em sistemas de fase reversa. As fases HILIC podem ser agrupadas em superfícies polares neutras ou superfícies iônicas. A Tabela 4 mostra algumas das diferentes estruturas das fases estacionárias encontradas na literatura que são aplicáveis à separação no modo HILIC.

Tabela 4. Diferentes fases estacionárias utilizadas em HILIC.

Fase sólida	Estrutura da fase sólida	Aplicação	Referências
Sílica não derivatizada		Fármacos e compostos polares básicos como acetilcolina, fluconazol, aciclovir.	(HEMSTRÖM; IRGUM, 2006); (STREGE; STEVENSON; LAWRENCE, 2000)
Fases ligadas por diol		Açúcares, ureia, glicina.	(TANAKA; ZHOU; MASAYOSHI, 2003)
Fases ligadas por amino		Proteínas e peptídeos, compostos ácidos.	(OYLER et al., 1996); (RUBINSTEIN, 1979)
Fases ligadas por amida		Peptídeos, fármacos, aminoácidos.	(YOSHIDA, 1998); (RISLEY; STREGE, 2000)
Polietilenoglicol/ sílica (HS PEG)		Iodeto, tiocianato em água do mar e sal comestível	(RONG; LIM; TAKEUCHI, 2005); (RONG; TAKEUCHI, 2004)
Fases ligadas por sulfoalquilbetaina zwitteriônica (ZIC-HILIC)		Açúcares, glicerol, carbonato de glicerol, ureia, glicoproteína	(NÚÑEZ, NAKANISHI; TANAKA, 2008); (FOURDINIER et al., 2010)

Fonte: Adaptado de Buszewski e Noga (2012).

Sílica gel não modificada apresenta algumas vantagens para HILIC, em comparação a fases estacionárias ligadas quimicamente. Em altos valores de pH, os grupos silanóis são ionizados e trocas catiônicas apresentam importante papel na retenção, especialmente para compostos básicos carregados positivamente (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Diol, amino, amida e outras fases ligadas usadas em HILIC são geralmente preparadas modificando quimicamente a superfície de sílica gel, como as fases C18 usadas para RP-LC (OYLER et al., 1996); (YOSHIDA; OKADA, 1999). As fases DIOL quimicamente ligadas demonstram alta polaridade e propriedades de ligação de hidrogênio, e não contêm grupos ionizáveis que não sejam silanóis residuais não reagidos significando que eles são apropriados para o modo HILIC (WANG; LI; RASMUSSEN, 2005).

Colunas de amino-sílica também são usadas no modo HILIC usualmente. Em geral, os analitos básicos ficam fortemente retidos em sílica gel por ligação de hidrogênio e interações de troca iônica com grupos silanol, enquanto os compostos ácidos mostram maior afinidade com as colunas de amino-sílica. (OYLER et al., 1996). Fases estacionárias ligadas quimicamente com outras funcionalidades, como polietilenoglicol ou grupos alquilas com amida incorporada ou carbamatos, são geralmente propostos em aplicações de RP-LC com fases móveis ricas em água. Por outro lado, quando a porcentagem de solvente orgânico é alta, a retenção de muitos compostos aumenta quando a concentração de acetonitrila aumenta, mostrando um comportamento típico de NP-LC (ALPERT, 1990); (FU et al., 2010); (KARLSSON; WINGE; SANDBERG, 2005).

Fases estacionárias de sulfoalquilbetaína zwitteriônica também foram introduzidas para separações HILIC. A camada ativa, que é inserida em sílica gel de poros largos ou em suporte de polímero, contém grupos fortemente ácidos de ácido sulfônico e grupos fortemente básicos de amônio quaternário, separados por um pequeno espaço de cadeia alquila. Neste tipo de fase assume-se que ocorrem interações do tipo troca iônica. As fases ligadas por sulfoalquilbetaína adsorvem fortemente a água por ligações de hidrogênio, e a camada de água, que faz parte da fase estacionária, controla amplamente o mecanismo de retenção. Colunas zwitteriônicas estão comercialmente disponíveis sob o nome comercial de ZIC-HILIC (em suporte de sílica gel) ou ZIC-*p*Hilic (em suporte de polímero) (GUO; GAIKI, 2005).

2.3.2 Escolha da fase móvel em HILIC

Uma fase móvel típica para cromatografia HILIC inclui solventes orgânicos polares miscíveis em água, tais como acetonitrila com uma pequena quantidade de água (ALPERT, 1990). No entanto, qualquer solvente aprótico que seja miscível em água (como exemplo, tetrahidrofurano, dioxano) podem ser usados. Álcoois também podem ser adotados, embora seja necessária uma concentração maior para atingir o mesmo grau de retenção do analito em comparação a uma combinação água-solvente aprótico (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006).

As separações em HILIC podem ser conduzidas tanto em modo isocrático, com altas porcentagens de solvente orgânico como em modo gradiente, começando com uma alta porcentagem de solvente orgânico e terminando com alta proporção de solvente aquoso (ALPERT, 1990).

Acredita-se que em HILIC, a fase móvel forma uma rica camada de água na superfície da fase estacionária polar e por outro lado, fase móvel deficiente em água, criando um sistema

de extração líquido-líquido. O analito é distribuído entre estas duas camadas (ALPERT, 1990); (NAIDONG, 2003).

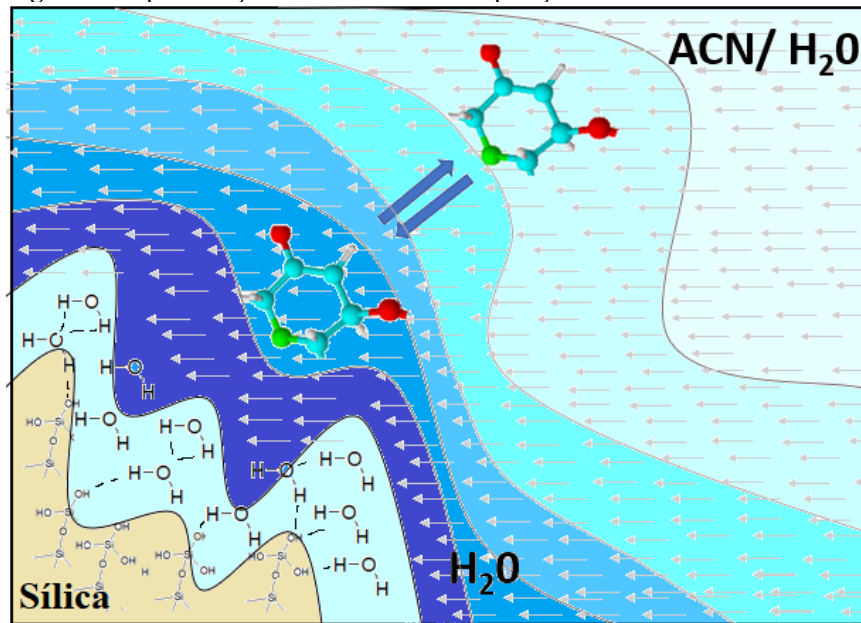
Na fase móvel utilizada em HILIC, o uso de aditivos iônicos, como acetato de amônio e formiato de amônio são utilizados com frequência para controlar o pH e a força iônica da fase móvel. Eles podem contribuir com a polaridade do analito, resultando em mudanças de retenção. Para analitos ionizáveis, o pH deve ser ajustado para garantir que o analito estará em uma única forma iônica (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

2.3.3 Mecanismo de separação no modo HILIC

De forma geral, mecanismo de retenção em cromatografia líquida é discutido em muitos artigos e até hoje, pesquisadores discordam sobre qual melhor teoria explica como funciona a retenção dos analitos. No entanto, existem três modelos aceitos para mecanismo de separação, são eles: 1º) o analito particiona entre a fase móvel e a fase estacionária (DILL, 1987); (YING; DORSEY; DILL, 1989); 2º) adsorção do analito na superfície do adsorvente (WANG; DUDA; RADKE, 1978); (RIEDO; KOVÁTS, 1982); 3º) assume que ocorre uma adsorção preferencial do modificador de fase orgânica na superfície do adsorvente, seguido da partição do analito na camada adsorvida (KNOX; PRYDE, 1975). O fenômeno da retenção em HPLC depende simultaneamente em vários tipos de interação intermolecular entre o soluto e a fase estacionária, o soluto e a fase móvel e a fase estacionária e a fase móvel (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Em HILIC, o mecanismo de separação ainda não foi completamente elucidado, no entanto, a teoria atual propõe que a retenção ocorre por particionamento. Neste modo, o mecanismo de separação é baseado na distribuição diferencial das moléculas do analito entre a fase móvel rica em acetonitrila e uma camada enriquecida com água adsorvida na fase estacionária hidrofílica (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Quanto mais hidrofílico o analito, mais o equilíbrio de partição é deslocado para a camada de água imobilizada na fase estacionária, e assim, mais o analito é retido. Em outras palavras, a separação em HILIC ocorre baseada nas polaridades dos compostos e no grau de solvatação das moléculas do analito e da fase estacionária (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Quando a concentração de acetonitrila (ou outro solvente orgânico) aumenta, a interação da água com a superfície fase estacionária polar também aumenta. Neste caso, a acetonitrila não consegue interagir com os silanóis residuais da fase estacionária e eles ficam livres e disponíveis para a água ser adsorvida neles, como está demonstrado na Figura 3 (DAWIDOWICZ; FIJALKOWSKA, 1995); (BUSZEWSKI et al., 2003).

Figura 3. Representação do mecanismo de separação em HILIC.



Fonte: Adaptado de Buszewski e Noga (2012).

Embora esteja bem estabelecido que a superfície hidrofílica retenha a água quando exposta a mistura de solventes orgânicos com água, a teoria do particionamento em HILIC é baseada apenas em evidência circunstancial. HILIC é mais do que apenas particionamento, o mecanismo de retenção inclui interações de doação de hidrogênio entre espécies polares neutras, bem como mecanismos eletrostáticos fracos sob condições de altas concentrações de solvente orgânico. Isso indica que o mecanismo HILIC é diferente daquele obtido em cromatografia de troca iônica. Existem estudos que mostram que o mecanismo de separação ocorre de diversos modos (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006). Alpert (ALPERT, 1990) considerou interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio como possíveis contribuintes para a partição dos analitos na camada de fase estacionária. Ele observou que os grupos básicos em um soluto levam a uma hidrofílicidade e retenção pronunciadas, de modo que essas interações fazem contribuições importantes para o mecanismo de separação.

Espera-se que as interações de analitos básicos e ácidos com a fase estacionária sejam baseadas em interações hidrofílicas e forças eletrostáticas. No entanto, o mecanismo final de separação do processo de eluição é provavelmente uma superposição de particionamento e interações eletrostáticas ou ligação de hidrogênio à fase estacionária (ALPERT, 1990); (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006). O grau de dominância de cada mecanismo depende do tipo real de fase estacionária utilizada e das condições do tampão, incluindo o nível e o tipo de solvente orgânico, o tipo e a concentração de sal e o pH (FU et al., 2010).

Uma boa técnica de separação deve ser aliada a um sistema de detecção eficiente, com isto será abordado como funciona um sistema de detecção baseado em espectrometria de massas.

2.4 SISTEMA DE DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmento de moléculas. Um espectro de massa fornece o número de íons detectados em cada valor da razão massa-carga, m/z . Os três componentes essenciais de qualquer espectrômetro de massa são: uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector (LANÇAS, 2009).

Para obter um espectro de massa, as moléculas devem estar no estado gasoso para serem então ionizadas, os íons formados são acelerados por um campo elétrico e direcionados para o tubo analisador, onde sofrem a ação de um campo magnéticos perpendicular à direção de propagação. O tubo é mantido sob alto vácuo, de modo a evitar que os íons sejam defletidos por colisões com moléculas do gás residual. O campo magnético no analisador de massas, deflete os íons na direção do detector, que se encontra na extremidade do tubo. Os íons mais pesados não sofrem deflexão e os mais leves são significativamente defletidos, ambos não atingem o detector (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Em um detector por multiplicação de elétrons, cada íon que alcança o detector originando uma cascata de elétrons. No multiplicador de elétrons, uma série de dinodos multiplica o número de elétrons por $\sim 10^6$ a 10^8 antes que alcancem o anodo no qual a corrente é medida. O espectro de massa registra a corrente proveniente do detector em função do valor da razão m/z selecionada pelo campo magnético. A maioria dos detectores mostra um sinal proporcional a velocidade com que os íons chegam ao detector. Os espectrômetros de massa podem detectar íons negativos por meio da troca das polaridades dos potenciais elétricos em que os íons são formados e detectados (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

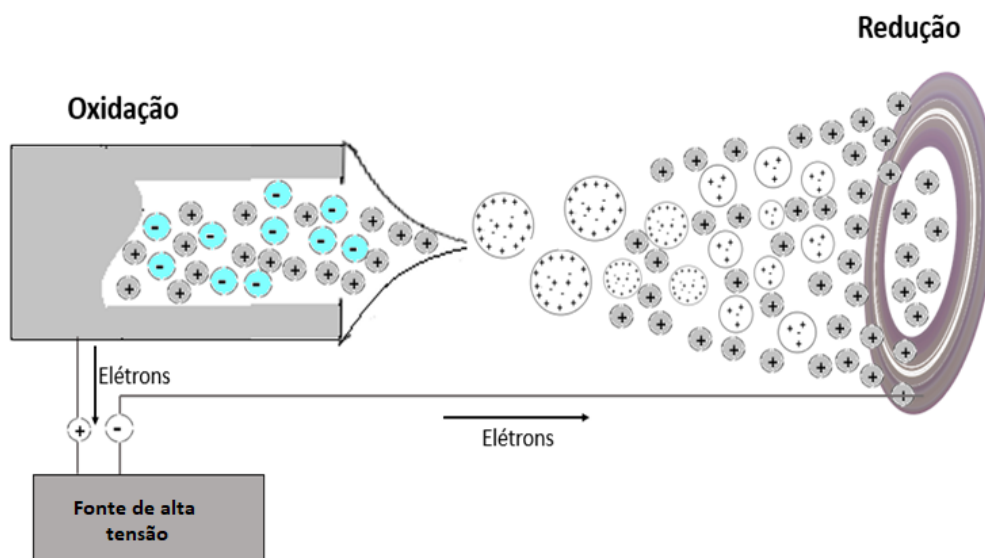
A espectrometria de massa é amplamente utilizada como sistema de detecção em cromatografia, pois a junção das duas técnicas permite obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre uma determinada amostra. Além disso, possibilita uma alta seletividade à análise. A espectrometria de massa exige utilização de alto vácuo para evitar colisões moleculares durante a separação dos íons e a cromatografia líquida, por sua vez, é uma técnica de alta pressão. O problema ao se acoplar as duas técnicas é a remoção de enorme quantidade de matéria presente entre o cromatógrafo e o espectrômetro. Na cromatografia líquida este

problema é ainda maior, pois o líquido proveniente da coluna forma um enorme volume de gás ao evaporar. Quase todo esse gás tem que ser removido antes de entrar da separação dos íons e aditivos não voláteis na fase móvel devem ser altamente evitados. A ionização por *electrospray* e a ionização química à pressão atmosférica são os métodos mais utilizados como sistemas de ionização para introdução da amostra no espectrômetro de massa. O quadrupolo é o analisador de massas mais popular no momento, devido a sua boa linearidade em análises quantitativas. Outros analisadores de massa comumente utilizados são o *ion trap*, o tempo de voo (TOF) e o *orbitrap* (HARRIS, 2017). Tendo em vista que o trabalho foi desenvolvido em um espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo, esses dois itens serão discutidos em mais detalhes.

2.4.1.1 Ionização pelo processo *electrospray*

O processo de ionização por *electrospray* permite a obtenção de íons na pressão atmosférica. Para melhor entendimento do funcionamento de uma fonte de ionização pelo processo *electrospray*, pode-se verificar a Figura 4.

Figura 4. Processo de formação do *electrospray* conduzidos para o espectrômetro de massa pelo campo elétrico aplicado



Fonte: Adaptado de Lanças (2009).

Como demonstrado na Figura 4, o anteparo à esquerda de cor cinza é um tubo capilar, no qual a amostra contendo os íons provenientes da amostra que saiu da coluna cromatográfica sofre oxidação. Portanto, a amostra dissolvida em um solvente apolar é pressurizada em tubo capilar feito de aço inox, através de uma fonte de alta tensão é aplicado uma voltagem entre

3000 e 5000 V. Como resultado, o líquido sai do capilar na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem o solvente e os íons são introduzidos ao espectrômetro de massa pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo. Em uma montagem típica de um sistema *electrospray* utiliza-se um gás em contracorrente, usualmente N₂, utilizado para diminuir os aglomerados de íons indesejáveis que se formam e para facilitar a eliminação do solvente. O *electrospray* pode ser operado no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá (LANÇAS, 2009).

Os dois mecanismos mais aceitos para explicar o fenômeno do processo *electrospray* foram propostos pelo pesquisador Dole, em 1968, chamado de mecanismo do resíduo de carga ou da fissão e o outro pelos pesquisadores Iribarne e Tomson, em 1976, chamado de mecanismo da evaporação do íon (LANÇAS, 2009). De acordo com Dole, à medida em que as gotículas evaporam, sua carga permanece inalterada, como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da carga imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores, denominada “explosão” coulômbica. Este processo continua até que apenas um íon do analito permaneça; após a evaporação da última gotícula do solvente, forma-se um íon em fase gasosa (LANÇAS, 2009).

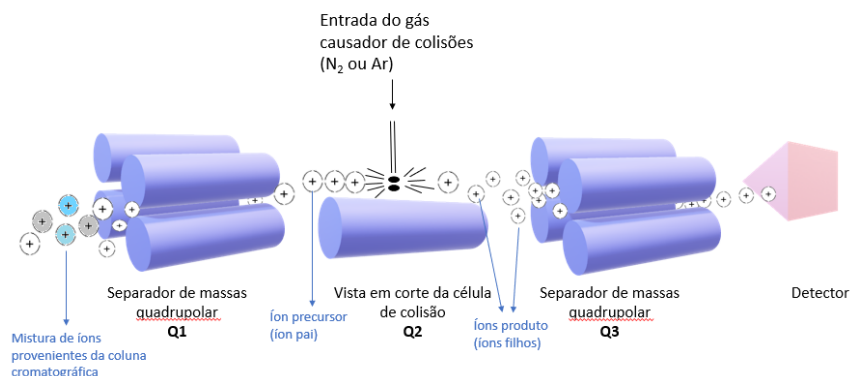
De acordo com Iribarne e Tomson, eles concordaram com Dole pequenas gotículas são formadas na explosão coulômbica, porém eles propõem que a partir da formação das gotículas, a força do campo elétrico na superfície destas é suficientemente elevada para removê-las da superfície, transferindo diretamente para a fase gasosa energeticamente mais favorável para íons solvatados. Mais recentemente, M. Cole propôs que os dois mecanismos podem operar simultaneamente. (LANÇAS, 2009).

2.4.1.2 Analisadores de massa triplo Quadrupolo

Este tipo de analisador de massa é muito utilizado para monitoramento seletivo de reações e é extremamente seletivo para o analito de interesse. Os analisadores de triplo quadrupolo são também conhecidos como espectrômetro MS/MS e são aqueles que apresentam três quadrupolos em sequência Q1, Q2 e Q3. Uma mistura de íons entra no quadrupolo Q1, que libera apenas um íon precursor selecionado para o segundo estágio, Q2, que é chamado de célula de colisão, o íon precursor colide com moléculas de N₂ em uma pressão de 10⁻⁸ a 10⁻⁶ bar e se fragmenta formando os íons produto. Na figura 5 está esquematizado o funcionamento

de um analisador de massa do tipo triploquadrupolo MS/MS (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Figura 5. Esquema de um analisador de massas do tipo triploquadrupolo MS/MS.



Fonte: Adaptado de Harris (2017).

De acordo com a Figura 5, a mistura de íons proveniente da fonte de ionização atravessa o separador de massas quadrupolar Q1, no qual os íons precursores, de acordo com as razões m/z selecionadas no método, são separados. Após isto, estes íons sofrem fragmentações através da entrada de gases causadores de colisões na célula de colisão Q2. Por fim, estes íons fragmentados (íons produto) passam por outro separador de massas quadrupolar Q3, no qual mais um vez os íons são selecionados de acordo com as razões m/z selecionadas no método e novamente são separados. Portanto, o quadrupolo Q3 permite que somente determinados íons produto passem para o detector.

O bom desempenho de qualquer técnica depende crucialmente de dois fatores: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos em sua verificação. Uma forma de assegurar a qualidade, aplicabilidade e o alcance de um método é por meio da utilização de parâmetros numa etapa conhecida como validação de métodos (RIBEIRO et al., 2008).

3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E PARÂMETROS ANALÍTICOS

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017). No Brasil, são dois órgãos que regulamentam as diretrizes da validação: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia,

Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Sendo que a ANVISA é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas suas fases de produção e o INMETRO é aplicável a todas as demais situações em que é necessário proceder com uma validação de método. O processo de validação é demorado e exigente e deve ser feito da forma mais criteriosa possível, pois é a etapa mais importante do desenvolvimento de métodos analíticos.

A validação é composta de parâmetros analíticos, que são indicadores quantitativos de bom desempenho do método e são eles: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. De acordo com a recomendação do INMETRO, os parâmetros que devem ser claramente descritos no procedimento e relatório de validação estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	✓	✓
Linearidade / faixa de trabalho		✓
Limite de detecção	✓	✓
Limite de quantificação		✓
Exatidão		✓
Precisão		✓
Robustez	(*)	(*)

(*) parâmetro opcional, Fonte: INMETRO (2018).

3.1 SELETIVIDADE

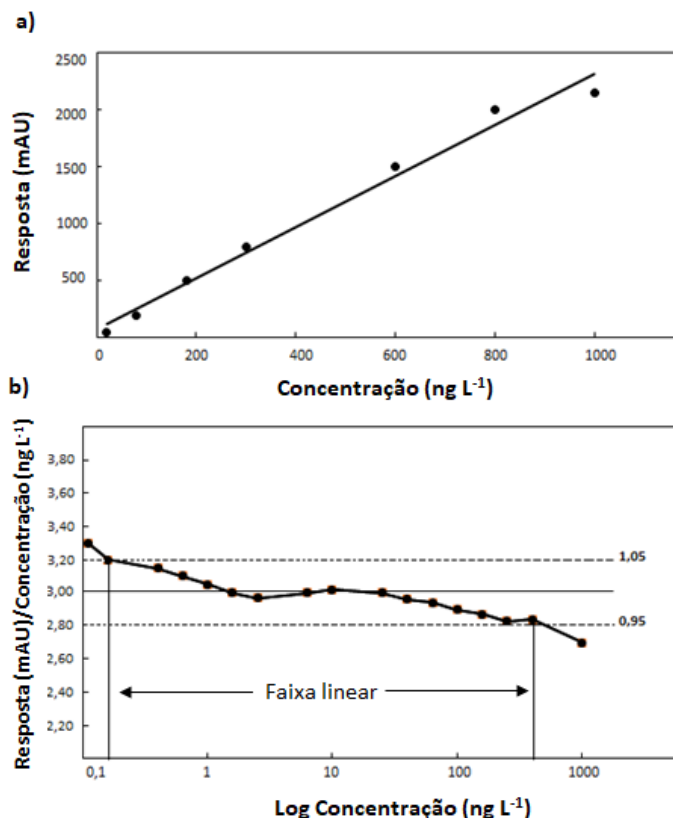
A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de assegurar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse a serem analisadas na presença de componentes que podem interferir na sua quantificação em uma amostra complexa. A seletividade pode ser obtida de diversas maneiras, a primeira forma é comparar uma matriz isenta da substância de interesse e a matriz adiciona da substância (padrão), sendo que neste caso nenhum outro interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância de interesse e esta deve estar bem separada dos demais componentes da amostra. Uma segunda maneira, é a utilização de detectores modernos (como arranjos de diodos e detectores de massas), que comparam o

espectro do sinal obtido com o de um padrão, isto confere grande confiança ao resultado obtido. Quando não é possível obter uma matriz isenta do analito de interesse, é possível utilizar o método de adição de padrão, no qual é feita uma curva de calibração com adição da substância de interesse e outra curva sem a presença da matriz, comparam-se as duas curvas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo. Como uma última alternativa ao estudo de seletividade, pode-se utilizar outra técnica cromatográfica ou ainda utilizar uma técnica própria de identificação como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectrometria no infravermelho ou bioensaios específicos (RIBANI et al., 2004).

3.2 LINEARIDADE

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados analíticos proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação entre a área do sinal da substância e sua concentração é determinada empiricamente e através destes dados, é construída a curva de calibração (Figura 6 a). Matematicamente, a estimativa dos coeficientes da equação da reta, obtidos experimentalmente, pode ser efetuado utilizando método matemático regressão linear. Além dos coeficientes **a** e **b** da regressão, pode ser calculado o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro indica a qualidade da curva, quanto mais próximo de 1 o coeficiente de correlação está, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e mais confiáveis são os valores dos coeficientes (RIBANI et al., 2004).

Figura 6. a) curva de calibração clássica b) gráfico da razão área/concentração vs. Concentração em escala logarítmica.



Fonte: Adaptado de Ribani et al. (2004).

A Figura 6 (a) é uma curva de calibração clássica, isto é, com as respostas no eixo y e as concentrações no eixo x, sendo assim, uma relação linear simples descrita pela equação $y = ax + b$. Esta curva de calibração é válida em determinada faixa de concentração da espécie estudada, onde é possível obter uma relação linear. Esta faixa de concentração, na qual se pode construir a curva de calibração, é chamada de faixa linear dinâmica. A Figura 6 (b) demonstra uma forma de verificar se os pontos de uma curva analítica estão inseridos na faixa linear. Através da razão dos dados do sinal pelas suas respectivas concentrações, obtém-se as respostas relativas, com estes dados é construído um gráfico com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. A linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear, então são desenhadas outras duas linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95 e 105 % da média ou mediana dos resultados de respostas relativas. O método é considerado linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 e 105% da linha da faixa linear (RIBANI et al., 2004).

3.2.1 Padronização externa

O método de padronização externa compara a área da substância na amostra com as áreas obtidas com soluções padrões de diferentes concentrações preparadas a partir de um padrão analítico com pureza conhecida. Com isto, obtém-se a curva de calibração, a sua equação de reta correspondente e relacionam-se as áreas dos analitos de interesse para determinar a concentração do analito nas amostras (RIBANI et al., 2004).

3.2.2 Padronização interna

O método de padronização interna consiste na adição de um composto chamado padrão interno às soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse. As exigências para a substância usada como padrão interno são: deve ser similar a substância a ser quantificada; ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra; não reagir com outras substâncias presentes ou outro componente da matriz e não deve fazer parte da amostra.

O gráfico da curva analítica apresenta a razão da área do analito de interesse pela área do padrão interno ($\frac{\text{Área}_{\text{analito}}}{\text{Área}_{\text{padrão interno}}}$) no eixo y e as concentrações no eixo x. O método de padronização interna é muito útil pois no caso de oscilação instrumental (devido a mudança de temperatura da coluna por exemplo), a área do padrão interno alterar juntamente com a área do analito e isto irá corrigir algum possível erro (RIBANI et al., 2004).

3.2.3 Simulação de matriz

O método da simulação de matriz (“*matrix-matched*”) consiste na adição de padrão em diferentes concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância de interesse, e constrói-se o gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado com padronização externa ou padronização interna. É utilizado para contornar os indesejáveis efeitos de matriz e a sua vantagem quando comparado a padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra.

3.2.4 Adição de padrão

O método de adição de padrão consiste em adicionar quantidades conhecidas do analito de interesse em quantidades conhecidas de amostra, ou seja, os pontos da curva são preparados diretamente na amostra diluída. Estas amostras com diferentes concentrações de padrão irão resultar em cromatogramas, e com as áreas do analito nestes cromatogramas constrói-se uma curva de calibração. O ponto onde a reta corta o eixo y representa a área do sinal do analito que está sendo determinado, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta obtida no eixo x define a concentração do analito de interesse na amostra.

O método de adição de padrão é trabalhoso, porém é essencial quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas ou quando houver dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou matriz isenta do analito (RIBANI et al., 2004).

3.3 PRECISÃO

A precisão deve avaliar a proximidade dos resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o coeficiente de variação (CV) da série de medições conforme a equação 1:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão;

\bar{x} = concentração média determinada.

As amostras devem ser preparadas de forma independente desde o início do procedimento descrito no método (ANVISA, 2017).

Normalmente, os métodos que quantificam compostos em macroquantidades requerem um CV de 1 a 2% e em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20% (RIBANI et al., 2004).

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média (IC), que é a faixa de valores que existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, calculada pela equação 2:

$$IC = \bar{x} \pm t_{n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde t_{n-1} é o valor crítico da distribuição de student com n-1 graus de liberdade (o valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança); s é o desvio padrão e n é o número de réplicas (RIBANI et al., 2004).

3.3.1 Repetibilidade

Considerando-se a recomendação adotada pela ANVISA, a determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios: avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação e utilizar no mínimo nove medições, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a concentração média da faixa linear (ANVISA, 2017). Para o INMETRO, a repetibilidade é a condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período. O número mínimo de repetições para cada nível de concentração deve ser entre 6 e 15 por material usado no estudo. É importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho (INMETRO, 2018).

É importante seguir critérios de aceitação para recuperação, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação. No Quadro 2, são apresentados os critérios sugeridos pelo INMETRO no documento DOQ-CGCRE-008, baseado na AOAC, 2016 (INMETRO, 2018); (INTERNATIONAL, 2016).

Quadro 2. Critério de aceitação da repetibilidade

Analito %	Fração Mássica (C)	Unidade	CV, %
100	1	100 %	1,3
10	10 ⁻¹	10 %	1,9
1	10 ⁻²	1 %	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1 %	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: Adaptado de INMETRO (2018); AOAC (2016).

3.3.2 Precisão intermediária

De acordo com a ANVISA, a determinação da precisão intermediária deve obedecer aos seguintes critérios: expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (ANVISA, 2017). Para o INMETRO, a precisão intermediária, refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas, tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2018).

3.3.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é feita comparando-se resultados obtidos em laboratórios diferentes, é considerada importante quando um laboratório deseja buscar a verificação do desempenho de seus métodos por meio de ensaios laboratoriais, ou ainda em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados (ANVISA, 2017); (INMETRO, 2018).

3.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível, essa recomendação é adotada pela ANVISA (2017). Os meios mais utilizados para avaliar a exatidão são: materiais de referência; comparação com método de referência; ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI et al., 2004).

3.4.1 Materiais de referência certificados

Os materiais de referência são substâncias comercializadas por organizações confiáveis e reconhecidas, como NIST (*Nacional Institute of Standards and Technology*), LGC (*Laboratory of the government chemist*); USP (*United States Pharmacopea*), entre outros. Estes materiais vêm com um certificado de análise, que traz a concentração conhecida da substância. Os valores obtidos pelo laboratório (média e estimativa do desvio padrão) da mesma substância devem ser comparados ao do certificado do material de referência, para verifica/r a exatidão do método.

3.4.2 Comparação com o método de referência

Esta outra forma de avaliar a exatidão consiste em comparar os resultados obtidos com o método que se deseja validar com os resultados conseguidos com um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os dois. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida (RIBANI, BOTTOLI, *et al.*, 2004).

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, entre as quais: testes de hipótese e planejamento de experimentos. No teste de hipótese, primeiro se aplica o Teste F para avaliar se as variâncias são estatisticamente iguais ou diferentes. O teste t (Student) é utilizado em seguida para verificar se as médias dos resultados de dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais (INMETRO, 2018).

3.4.3 Ensaio de recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas da substância de interesse. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três concentrações diferentes: baixa, média e alta da faixa linear do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação, então é necessário tomar cuidado em relação a isso (INMETRO, 2018). De qualquer forma, a recuperação é calculada através da equação 3:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde,

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada

C_3 = concentração do analito adicionado à amostra fortificada

É importante que seguir critérios de aceitação para recuperação, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação. No Quadro 3, apresentam-se os critérios sugeridos pelo INMETRO no documento DOQ-CGCRE-008, baseado na AOAC, 2016 (INMETRO, 2018; INTERNATIONAL, 2016).

Quadro 3. Critério de aceitação da recuperação.

Analito %	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média, %
100	1	100 %	98 – 102
10	10^{-1}	10 %	98 – 102
1	10^{-2}	1 %	97 – 103
0,1	10^{-3}	0,1 %	95 – 105
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10^{-7}	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	80 – 110
0,000001	10^{-8}	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	60 – 115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	40 – 120

Fonte: Adaptado de INMETRO (2018); INTERNATIONAL (2016).

3.5 LIMITE DE DETECÇÃO

Por definição, o limite de detecção representa a menor concentração da substância de interesse, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com determinado método analítico. O limite de detecção pode ser obtido de três formas: método visual, método relação sinal/ruído e baseado na em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (RIBANI et al., 2004).

Para métodos visuais, o limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas dos analitos ou valores de propriedades conhecidos e pelo estabelecimento de um nível mínimo em que o analito pode ser detectado, ou seja, visto (RIBANI et al., 2004).

Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído. A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras

com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 3:1, proporção geralmente aceita como estimativas do limite de detecção (RIBANI et al., 2004). Para a determinação baseada em parâmetros da curva de calibração, o limite de detecção pode ser calculado pela equação 4.

$$LD = 3,3x \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

S = coeficiente angular da curva analítica.

3.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Por definição, o limite de quantificação representa a menor concentração da substância de interesse, que pode ser quantificada, utilizando o método que se está validando. O limite de quantificação pode ser obtido de três formas: método visual, método relação sinal/ruído e baseado em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (RIBANI et al., 2004).

Para métodos visuais, o limite de quantificação é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas dos analitos ou valores de propriedades conhecidos e pelo estabelecimento de um nível mínimo em que o analito pode ser quantificado com recuperação e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído. A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 10:1, proporção geralmente aceita como estimativas do limite de quantificação (RIBANI et al., 2004). Para a determinação baseada em parâmetros da curva de calibração, o limite de quantificação pode ser calculado pela equação 5:

$$LQ = 10x \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

S = coeficiente angular da curva analítica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para determinação de 19 ácidos orgânicos alifáticos em matrizes alimentícias utilizando o modo de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) em sistema LC-MS/MS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas para o monitoramento de cada um dos ácidos orgânicos alifáticos por monitoramento de reações múltiplas (acético, aminocapróico, ascórbico, aspártico, cetoglutárico, fumárico, glicólico, glucônico, glutâmico, glutárico, isobutírico, láctico, levulínico, maleico, málico, malônico, pirúvico, propiônico e succínico);
- Determinar os ácidos orgânicos alifáticos selecionando as condições ideais para a separação dos analitos por HILIC-MS/MS, incluindo coluna cromatográfica, a composição da fase móvel, concentração de aditivo formiato de amônio e volume de injeção;
- Avaliar o desempenho analítico do método através da seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, estudo do efeito de matriz e avaliação da precisão;
- Aplicação do método em amostras alimentícias (vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os padrões utilizados foram de grau analítico. Foram utilizados os padrões analíticos dos ácidos acético, aminocapróico, ascórbico, aspártico, cetoglutárico, fumárico, glicólico, glucônico, glutâmico, glutárico, isobutírico, láctico, levulínico, maleico, málico, malônico, pirúvico, propiônico e succínico. E como padrão interno, foram utilizados padrão analítico de ácido mucônico. Utilizou-se acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, Estados Unidos) como fase móvel. Solução comercial de hidróxido de amônio 10% grau HPLC (Sigma Aldrich[®], Alemanha) e ácido fórmico 85% P.A. (Synth, Brasil) foram utilizados para preparar solução tampão utilizada como fase móvel.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura em sistema Milli-Q (Millipore[®], Bedford, MA, USA), com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25 °C. As soluções padrões dos ácidos orgânicos foram preparadas individualmente em água ultrapura com concentração final aproximada de 1000 mg L⁻¹ e a solução padrão de padrão interno foi preparada em água ultrapura com concentração final aproximada de 500 mg L⁻¹, todas estas soluções foram armazenadas sob refrigeração.

5.2 INSTRUMENTAÇÃO LC-MS/MS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO OTIMIZADO

Neste trabalho, foi utilizado um HPLC obtido da Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador online (G1322A), bomba quaternária (G1311A), compartimento de colunas com controle de temperatura independente (G1316A), autoamostrador (G1367B). O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadropolo e íon trap linear, modelo Q Trap 3200 da Applied Biosystems (Concord, Canada). O software Analyst versão 1.6.2 foi usado para controlar o LC-MS/MS e fazer o tratamento dos dados obtidos nas análises. Os experimentos foram realizados usando a fonte TurboIonSpray[™] (electrospray-ESI) no modo íon negativo. A agulha do capilar foi mantida a 5500 V.

As separações foram feitas utilizando uma coluna SeQuant[®] ZIC[®]-HILIC (150 mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno; 3,5 μ m e 100 Å de tamanho de partícula) da marca Merck (Darmstadt, Germany), no modo isocrático usando uma fase móvel composta por acetonitrila : solução tampão formiato de amônio (75 : 25 v/v). A vazão da fase móvel foi de

500 $\mu\text{L min}^{-1}$. O volume de injeção das amostras e padrões foi 15 μL . A temperatura da coluna foi fixada em 30 °C. Alguns dos parâmetros do espectrômetro de massas: gás de cortina 10 psi; temperatura da fonte 350 °C; gás nebulizador 1,45 psi; gás de secagem 2,45 psi; gás da dissociação induzida por colisão médio. Os ácidos orgânicos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de reações múltiplas.

5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por meio de infusões diretas de soluções aquosas contendo os analitos. Para as infusões diretas, foi utilizada uma seringa com capacidade de 1 mL e diâmetro interno de 4,6 mm contendo as soluções padrões dos analitos. Esta seringa foi posicionada em um compartimento do espectrômetro em que o seu embolo era pressionado pela bomba acoplada ao espectrômetro a uma vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Ao se realizar este procedimento, o espectrômetro efetuou a otimização dos parâmetros eletrônicos envolvidos no processo de ionização de cada composto, sendo eles potencial de desagregação, potencial de entrada, energia de colisão, potencial de entrada na célula de colisão e potencial da célula de saída de forma automática. A probe foi mantida de acordo com recomendações do fabricante em 5,0 e 10,0 mm, respectivamente para as direções horizontal e vertical até o fim da infusão.

5.4 OTIMIZAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para garantir desenvolvimento do método cromatográfico, foram otimizados diversos parâmetros cromatográficos como será demonstrado nos próximos itens.

5.4.1 Seleção da coluna

Nesta etapa do trabalho, foram testadas as seguintes colunas cromatográficas: (1) LARIHC- CF6-P 5 μm 150 x 4,6 mm, (2) SeQuant® ZIC®-HILIC 3,5 μm , 100Å 150 x 4,6 mm e (3) SeQuant® ZIC®-HILIC 3,5 μm , 200Å 150 x 2,1 mm.

As avaliações das colunas foram realizada com mistura dos ácidos orgânicos em concentração 2 mg L^{-1} , com a composição da fase móvel utilizou-se 60% de acetonitrila e 40% de água ultrapura, fluxo de fase móvel de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, temperatura das colunas mantidas a 30

°C e volume de injeção de 10 µL para as colunas (1) e (2). Para a coluna (3) foi utilizada mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L⁻¹, e houve necessidade de utilizar fluxo de fase móvel de 100 µL min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL, devido menor capacidade de amostra, estes valores estão de acordo com o especificado no manual da coluna, os outros parâmetros foram mantidos iguais. Os parâmetros do MS/MS são os mesmos descritos no item 5.2. Para avaliação da eficiência das colunas, foi utilizado parâmetro de número de pratos (N) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), demonstrado na Equação 6:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, t_r = tempo de retenção;

w_b = largura para determinado sinal de analito.

5.4.2 Composição da fase móvel

Após a escolha da coluna, foi realizada a otimização da composição da fase móvel. Inicialmente foi testada fase móvel aquosa, porém os sinais ficaram com tempos de retenção muito próximos entre si. Foi constatada a necessidade de usar aditivo iônico para controlar o pH e a força iônica da fase móvel. Esta otimização está explicada nos itens a seguir.

5.4.3 Proporção de solvente orgânico e pH

Para os testes de proporção de fase móvel, injetou-se uma mistura dos ácidos orgânicos de concentração 5 mg L⁻¹ na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3,5µm, 100Å 150 x 4,6 mm, temperatura da coluna de 30 °C, volume de injeção de 10 µL e fase móvel foi variada para realização desta etapa estudo. Os parâmetros do MS/MS são os mesmos descritos no item 5.2.

Foi adotada a matriz de planejamento *Doehlert* para definir a melhor proporção de fase móvel e melhor pH para a fase aquosa. Foram utilizadas soluções tampão formiato de amônio para o estudo de pH. O desenho típico deste planejamento consiste em um hexágono, sendo cada vértice uma condição diferente e o ponto central é realizado em triplicata, totalizando assim 9 experimentos. As variáveis escolhidas foram pH da fase aquosa em três níveis (3, 4 e 5) e percentual de acetonitrila, estudado em cinco níveis (50, 60, 70, 80 e 90). Mesmo sabendo que 50 % de acetonitrila não se configura como um mecanismo HILIC, optou-se por esta para completar os cinco níveis. Através destes cromatogramas, foram obtidos dados referentes ao

tempo de retenção e fator de retenção (k') (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), demonstrado na Equação 7:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde, t_r = tempo de retenção;

t_m = tempo morto da coluna.

Além disso, tendo em vista a grande quantidade de analitos e, para se obter um resultado “compromisso” entre as respostas para os compostos estudados, foi proposta a utilização de uma equação que consiste no produto de todos os k' dividido pelo produto de todas as larguras dos sinais cromatográficos (w), multiplicado pelo maior tempo de retenção, conforme equação 8. A matriz de experimentos utilizada no planejamento *Doehlert* está representada na Tabela 6.

$$\text{Fator de resposta} = \frac{\prod k'}{\prod w \cdot tr_{maior}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde: $\prod k'$ = produto de todos fatores de retenção obtidos;

$\prod w$ = produto de todas larguras de sinal obtidas;

tr_{maior} = maior tempo de retenção.

Tabela 5. Experimentos realizados no planejamento *Doehlert*, para a escolha da melhor proporção da fase móvel e pH do tampão da fase aquosa.

Experimento	% Acetonitrila	pH do tampão
1	50	4
2	60	5
3	60	3
4	80	5
5	80	3
6	90	4
7	70	4
8	70	4
9	70	4

Fonte: Autora.

Os dados deste estudo foram tratados no *software Statistica 8.0*, sendo obtida uma superfície utilizando-se o fator de resposta proveniente da Equação 8.

5.4.4 Efeito da concentração de sais na fase móvel

Para os testes de concentração de sal na fase móvel, injetou-se uma mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L⁻¹ na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm, 100Å 150 x 4.6

mm, temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de 10 µL e fase móvel 75% de acetonitrila e 25% de solução tampão formiato de amônio pH 3. Temperatura da coluna 30 °C e volume de injeção de 15 µL. Os parâmetros do MS/MS são os mesmos descritos no item 5.2.

Nesta etapa do estudo foi avaliado apenas o efeito da concentração do sal adicionado, o pH foi mantido próximo de 3. Foram avaliadas as concentrações de 1 a 30 mmol L⁻¹ de formiato de amônio como aditivo. Para o cálculo da concentração necessária de hidróxido de amônio e ácido fórmico para resultar no pH e na força iônica desejados, foi utilizado o *software PeakMaster*[®], e as foram preparadas soluções tampão formiato de amônio nas concentrações 1 a 30 mmol L⁻¹. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro fornecido pela Micronal (São Paulo, Brasil) modelo B474, com eletrodo de referência de Ag/ AgCl (Tabela 7).

Tabela 6. Concentração de formiato de amônio (NH₄COOH) adicionado para o estudo do efeito da variação da concentração das soluções tampão preparadas, e os respectivos pH obtidos com auxílio de pHmetro.

Experimento	pH	Concentração de NH ₄ COOH adicionada (mmol L ⁻¹)
1	3,02	1,0
2	3,35	4,0
3	3,35	8,0
4	3,38	20,0
5	3,35	30,0

Fonte: Autora.

5.4.5 Avaliação do volume de injeção

Para os testes de avaliação de volume de injeção, injetou-se uma mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L⁻¹ na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm,100Å 150 x 4.6 mm, temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de foi variado de 5, 15, 25, 35 e 45 µL e fase móvel 75% de acetonitrila e 25% de solução tampão formiato de amônio pH 3 força iônica 10. Temperatura da coluna 30 °C e volume de injeção de 15 µL. Os parâmetros do MS/MS são os mesmos descritos no item 5.2.

5.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO

A avaliação dos parâmetros de mérito do método foi realizada injetando soluções padrão e amostras na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm,100Å 150 x 4.6 mm, temperatura da coluna 30 °C, volume de injeção de 15 µL e fase móvel Acetonitrila : solução tampão formiato

de amônio pH 3 força iônica 10 (75 : 25 v/v). Temperatura da coluna 30 °C e volume de injeção de 15 µL. Os parâmetros do MS/MS são os mesmos descritos no item 5.2.

5.5.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir das curvas de calibração em solução padrão construída em triplicata e em vinte e dois níveis de concentrações dos ácidos orgânicos devido à alta possibilidade de os ácidos apresentarem distintas faixas lineares. Para construir as curvas de calibração foi utilizado o *software Excel*[®]. No mesmo *software* foram feitos os estudos estatísticos com o recurso de análise de dados e regressão linear. A faixa de trabalho estudada foi de 0,01 a 30,0 mg L⁻¹. Os parâmetros das curvas de calibração foram obtidos através de regressão linear e, também foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965), e o ajuste ao modelo linear foi feito empregando o teste F (SNEDECOR e COCHRAN, 1989). O gráfico dos resíduos foi realizado para verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*) e estão demonstrados no APÊNDICE B. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5%. A ANVISA (ANVISA, 2017) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90.

5.5.2 Ensaio de adição e recuperação

As curvas de calibração na matriz foram construídas usando o método de adição de padrão nas matrizes de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte. A faixa de trabalho estudada foi de 1,0 a 8,0 mg L⁻¹. Para avaliação do efeito de matriz, fez-se a comparação das inclinações das curvas em solução padrão e das curvas de adição de padrão. Calculou-se as recuperações através das áreas obtidas relacionadas as curvas de adição de padrão.

O efeito de matriz foi avaliado em duas diluições diferentes e todas as amostras foram diluídas com água ultrapura. O vinagre foi diluído 50 e 200 vezes, o vinho foi diluído 100 e 500 vezes, a cerveja foi diluída 10 e 100 vezes, o suco de laranja foi diluído 100 e 500 vezes e o iogurte foi diluído 30 e 250 vezes.

5.5.3 Ensaios de precisão

A precisão foi determinada a partir de três injeções consecutivas de soluções das amostras fortificadas em quatro níveis de concentrações, injetados em três dias diferentes. Em todos a concentração do padrão interno ácido mucônico foi constante (2 mg L^{-1}) e o CV foi avaliado em função das áreas normalizadas obtidas. A AOAC (AOAC, 2016) considera adequados CV da ordem de até 11%, para níveis de concentração da ordem de mg L^{-1} .

5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Dez amostras foram utilizadas para aplicação do método: uma de vinagre balsâmico, duas amostras de vinagre de cana-de-açúcar, duas amostras de vinagre de maçã e uma amostra de vinagre de mel. As amostras foram injetadas em duplicata. Todas as amostras foram diluídas com água 50 e 200 vezes e as concentrações dos ácidos orgânicos encontrados foram calculadas através de curva de calibração injetada no mesmo dia da análise. Foram determinados os ácidos orgânicos presentes nas amostras utilizadas para estudo de efeito de matriz e as diluições foram realizadas da mesma forma como descrito no item 5.5.2.

Também foram utilizadas amostras de vinho tinto orgânico (diluído 100 e 500 vezes), cerveja pilsen lager (diluída 10 e 100 vezes), suco de laranja industrializado sem adição de conservantes (diluído 100 e 500 vezes), e iogurte grego com calda sabor morango (diluído 30 e 250 vezes). Os resultados de ácidos orgânicos foram obtidos através de extrapolações das curvas de adição de padrão construídas.

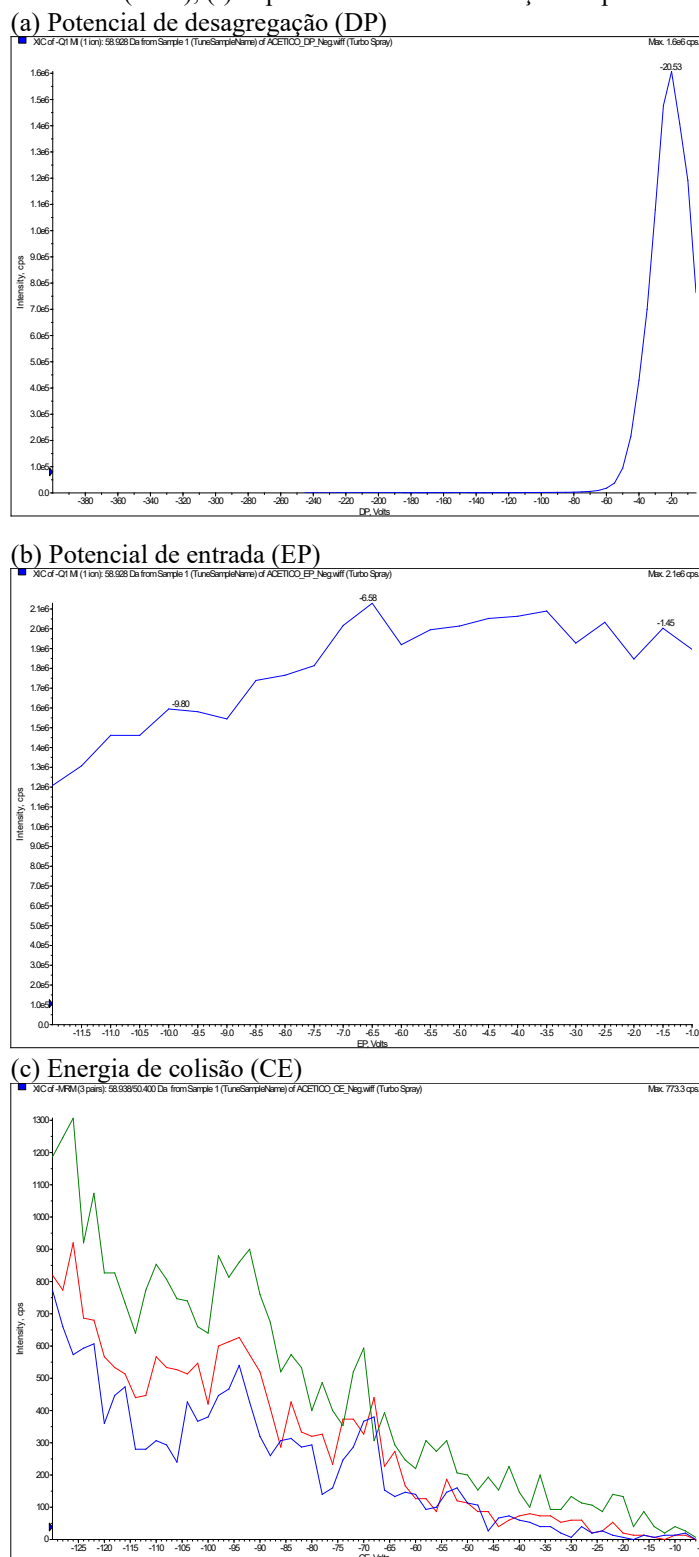
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

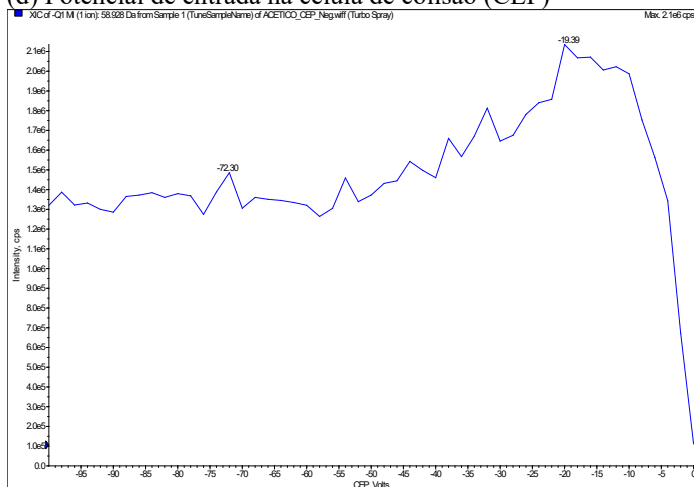
6.1.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para obtenção dos íons precursores e quantitativos dos analitos

O primeiro passo para o desenvolvimento do método foi definir os parâmetros do sistema de detecção. Foi definida a polaridade negativa para operar na fonte de ionização. Após isso, foi realizada a infusão direta de todos os ácidos orgânicos no espectrômetro de massa. Esta etapa é crucial no desenvolvimento analítico, pois este procedimento gera o padrão de fragmentação dos analitos, que é o seu espectro de massa. Com esta informação é possível confirmar a identidade dos componentes presentes nas amostras que serão posteriormente analisadas. Os ácidos orgânicos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de soluções aquosas contendo os analitos de interesse. Para fins de ilustração são apresentados os gráficos das otimizações dos parâmetros do MS/MS para o ácido acético na Figura 7.

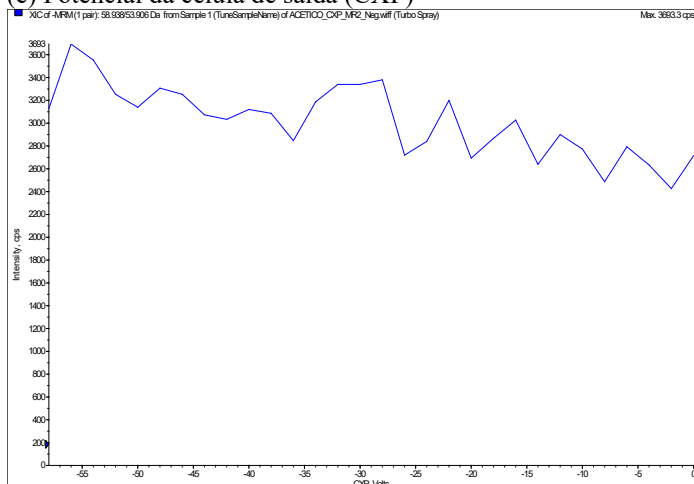
Figura 7. Parâmetros otimizado no espectrômetro de massas do ácido acético (a) Potencial de desagregação (DP), (b) Potencial de entrada (EP), (c) Energia de colisão (CE), (d) Potencial de entrada na célula de colisão (CEP), (e) Potencial da célula de saída (CXP), (f) Espectro resultante. Condições experimentais vide seção 5.3.



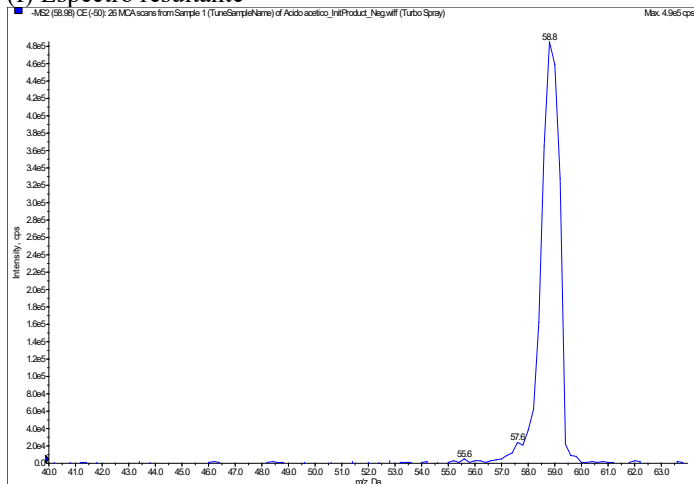
(d) Potencial de entrada na célula de colisão (CEP)



(e) Potencial da célula de saída (CXP)



(f) Espectro resultante



Fonte: Autora.

Os gráficos apresentados (Figura 7(a) – (e)) são resultados da otimização das energias envolvidas em todo processo presente no sistema de detecção MS/MS para cada analito. No

espectro resultante (Figura 7(f)), o sinal demonstra o íon precursor de razão m/z 58,8 como resultado na ionização do ácido acético. A infusão de cada analito gerou estes gráficos de energia e um espectro. Os valores dos íons precursores, íons quantitativos, bem como os valores de potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), energia de colisão (CE), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), potencial da célula de saída (CXP) para os 19 analitos utilizados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Informações de cada composto ácido orgânico analisado no LC-MS/MS (modo negativo). A agulha capilar foi mantida a -4500V. Parâmetros do MS/MS: gás de cortina 10 psi; temperatura da fonte 350 °C; gás nebulizador 1,45 psi; gás de secagem 2,45 psi; gás da dissociação induzida por colisão médio. Compostos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de múltiplas reações (MRM). Otimização do espectrômetro de massas foi feito através das infusões diretas de soluções aquosas contendo os analitos investigados.

Ácido	Íon precursor m/z (Q1)	Íon quantitativo m/z (Q3)	DP	EP	CEP	CE	CXP
Acético	58,938	56,4	-20	-4	-18	-128	-56
	58,938	51,1	-20	-4	-18	-130	-42
	58,938	52,9	-20	-4	-18	-126	-48
Aminocapróico	130	130	-25	-5	-10	-6	-2
	174,764	115,1	-30	-8	-8	-22	0
Ascórbico	174,764	87,2	-30	-8	-8	-22	0
	174,764	58,8	-30	-8	-8	-24	0
Aspártico	131,909	88	-20	-4,5	-10	-16	0
	131,909	115	-20	-4,5	-10	-14	0
Cetoglutárico	144,816	101,2	-20	-4,5	-10	-14	0
	144,816	56,9	-20	-4,5	-10	-18	0
	144,816	73,1	-20	-4,5	-10	-20	0
Fumárico	114,898	96,8	-25	-4	-10	-10	-2
Glicólico	74,888	47,2	-25	-4,5	-14	-12	-4
	74,888	44,9	-25	-4,5	-14	-12	-8
	74,888	60,6	-25	-4,5	-14	-118	-54
Glucônico	194,864	75,1	-20	-5,5	-10	-26	-2
	194,864	99	-20	-5,5	-10	-22	-2
	194,864	58,9	-20	-5,5	-10	-34	0
Glutâmico	145,921	102	-25	-2,5	-18	-16	0
	145,921	128	-25	-2,5	-18	-16	0
	145,921	85,2	-25	-2,5	-18	-20	0
Glutárico	130,877	87,1	-25	-1,5	-12	-14	0
	130,877	112,9	-25	-1,5	-12	-10	0
	130,877	41	-25	-1,5	-12	-54	-4
Isobutírico	102,871	57,2	-25	-3	-10	-16	0
	102,871	45,1	-25	-3	-10	-16	-4
	102,871	41,1	-25	-3	-10	-30	-4

Fonte: Autora.

Tabela 7. (continuação)

Ácido	Íon precursor m/z (Q1)	Íon quantitativo m/z (Q3)	DP	EP	CEP	CE	CXP
Lático	88,878	43,1	-25	-8	-18	-16	-4
	88,878	45	-25	-8	-18	-16	-6
	88,878	40,9	-25	-8	-18	-32	-6
Levulínico	114,8	70,9	-25	-8,5	-12	-14	-2
	114,8	96,7	-25	-8,5	-12	-14	-2
	114,8	69,7	-25	-8,5	-12	-20	-58
Maleico	114,821	71,2	-15	-6,5	-12	-14	0
Málico	132,841	71	-35	-9,5	-28	-18	-2
	132,841	114,8	-35	-9,5	-28	-12	-20
	132,841	73	-35	-9,5	-28	-20	0
Malônico	102,848	59	-35	-1,5	-16	-14	-6
	102,848	58,3	-35	-1,5	-16	-14	-58
	102,848	41	-35	-1,5	-16	-36	-4
Mucônico	140,842	96,9	-20	-5	-10	-12	-2
	140,842	96,7	-20	-5	-10	-14	-48
	140,842	96	-20	-5	-10	-14	-58
Pirúvico	86,881	42,8	-20	-5	-18	-12	-4
	86,881	42,4	-20	-5	-18	-12	-48
Propiônico	74	74	-20	-10	-12	-6	0
Succínico	116,832	73	-30	-6	-10	-14	0
	116,832	99,1	-30	-6	-10	-14	-2
	116,832	55,1	-30	-6	-10	-18	0

Fonte: Autora.

Todos estes parâmetros otimizados foram usados para monitoramento dos analitos nas amostras, incluindo identificação e quantificação.

6.1.2 Seleção da coluna cromatográfica

Na literatura a maioria dos trabalhos publicados sobre análise de ácidos orgânicos por HPLC utilizaram colunas de fase reversa C8 ou C18. Poucos trabalhos envolvendo a determinação de ácidos orgânicos utilizando-se coluna HILIC e HPLC-MS/MS estão reportados na literatura, um deles consiste na determinação simultânea de sete ácidos orgânicos em urina de rato como biomarcadores de exposição ao realgar por HILIC-MS/MS (HUANG et al., 2012). Realgar é um medicamento tradicional utilizado na China, composto por As_4S_4 , por apresentar arsênio em sua composição a toxicidade do realgar sempre foi questionada.

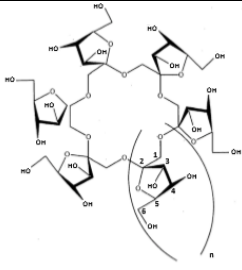
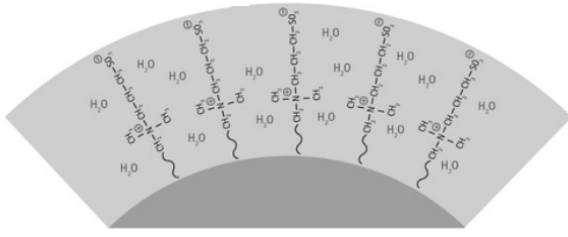
No presente trabalho foi proposta a utilização de coluna HILIC, sendo as seguintes colunas testadas: (1) LARIHC CF6-P, (2) SeQuant® ZIC®-HILIC e (3) SeQuant® ZIC®-HILIC. A coluna (1) LARIHC- CF6-P é uma coluna cromatográfica a base de ciclofrutano nativo (CF-6), desenvolvida pelo

grupo do professor Dr. Daniel Armstrong e comercializada pela empresa AZYP (Texas, Estados Unidos). Os ciclofrutanos eram utilizados apenas como aditivos de bens de consumo, porém em 2009 o grupo do prof. Dr Daniel Armstrong começou a sintetizar CF e utilizar como fase estacionária quiral para colunas cromatográficas de HPLC (SUN et al., 2009). Os ciclofrutanos consistem em seis ou mais unidades de D-frutofuranose, e cada unidade de frutofuranose contém quatro centros estereogênicos e três grupos hidroxila. Seu núcleo central tem a mesma estrutura que os respectivos éteres de coroa. A estrutura do CF6 (representada na Tabela 8) apresenta 6 hidroxilas ligadas nas posições 3, sendo que a metade fica apontada para o centro da molécula e a outra metade dirigida para fora e três átomos de oxigênio apontados para dentro do centro molecular, muito próximos um do outro. Como resultado, o acesso ao núcleo da 18-coroa-6 naquele lado do macrociclo fica bloqueado pelas ligações de hidrogênio formadas entre as hidroxilas. Este lado do macrociclo é relativamente hidrofílico como resultado da direcionalidade de todos seus grupos hidroxila, enquanto o outro lado do CF6 parece ser mais hidrofóbico, resultante dos grupos metileno em torno do recuo central (SUN, WANG, *et al.*, 2009). A colunas LARIHC é utilizada para separações enantioméricas, e tem sido empregada como fase estacionária polar para aplicações em HILIC.

As outras duas colunas testadas (2) SeQuant® ZIC®-HILIC e (3) SeQuant® ZIC®-HILIC ambas fornecidas pela empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). As duas colunas apresentam fases estacionárias a base de compostos zwitteriônicos, que são caracterizados por apresentar cargas positivas e negativas na superfície (demonstrado na Tabela 8). Isso faz com que além do mecanismo de separação ocorrer por uma partição das moléculas de soluto entre o eluente da fase móvel e uma camada enriquecida com água na fase estacionária HILIC hidrofílica, irão existir interações de natureza eletrostáticas entre os analitos e a fase estacionária. No entanto, as interações eletrostáticas entre as duas cargas opostas, devido à proximidade entre si, podem enfraquecer as interações eletrostáticas entre analitos carregados e a fase estacionária (PALMA et al., 2011). Esta coluna é tipicamente usada para separações de compostos pequenos, polares, neutros ou carregados. A principal diferença entre as duas colunas é o diâmetro interno, é menor que a metade para a coluna (3) fazendo com que a capacidade de amostra seja menor. No manual da coluna (3), consta que o ela deve ser operada a um fluxo máximo de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção máximo de $5 \mu\text{l}$.

Uma mistura de ácidos orgânicos de concentração 2 mg L^{-1} para as colunas (1) e (2), 5 mg L^{-1} para a coluna (3). Utilizou-se acetonitrila: água ultrapura (60:40 v/v) como fase móvel. Volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ para as colunas (1) e (2), $5 \mu\text{L}$ para a coluna (3). Temperatura das colunas foi mantida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Fluxo de fase móvel de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ para as colunas (1) e (2), $100 \mu\text{L min}^{-1}$ para a coluna (3). Para escolha da melhor coluna foram avaliados os parâmetros de número de pratos médio e largura de sinal média. Estas informações constam na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados das colunas testadas. Avaliação realizada com uma mistura dos ácidos orgânicos em concentração 2 mg L^{-1} para colunas (1) e (2), 5 mgL^{-1} para coluna (3), composição da fase móvel: 60% de acetonitrila e 40% de água ultrapura, fluxo de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ para as colunas (1) e (2), $100 \mu\text{L min}^{-1}$ para coluna (3), temperatura das colunas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ para as colunas (1) e (2), $5 \mu\text{L}$ para coluna (3).

Coluna	(1) LARIHC CF6-P	(2) SeQuant® ZIC®-HILIC	(3) SeQuant® ZIC®-HILIC
Estrutura da fase ligada			
Número de analitos detectados	15	16	9
Número de pratos médio	881	1686	1144
Tempo de retenção do último analito (min)	15,46	9,56	12,64
Largura do sinal médio (min)	0,9682	0,7061	1,1148

Fonte: Autora.

Foi escolhida como melhor coluna a número (2) SeQuant® ZIC®-HILIC de 150 mm de comprimento, $3,5 \mu\text{m}$ e 100 \AA de tamanho de partícula e 4,6 mm de diâmetro interno. Conforme demonstrado na Tabela 11, foi a coluna que apresentou maior número de analitos, maior número de pratos, portanto mais eficiente e menor largura de sinal médio. Outro motivo da escolha foi pelos cromatogramas obtidos (demonstrados no APÊNDICE A), o melhor cromatograma foi o da coluna (2) pois os sinais estão mais separados entre si e as larguras de picos são menores. Para satisfazer o mecanismo de separação HILIC, deve se utilizar de 60 a 90 % de fase móvel orgânica, além disso é favorável ao uso de soluções tampões aquosos para ajuste de pH adequado da fase móvel. No próximo item está descrito como foi realizada a otimização da proporção da fase móvel e pH.

6.1.3 Otimização da proporção de fase móvel

Depois de escolhida a melhor coluna, foi realizada a otimização da composição da fase móvel. Como o mecanismo HILIC deve ter pelo menos 60% de fase orgânica, avaliou-se acetonitrila em diferentes proporções: 60, 70, 80 e 90 % e o restante de água ultrapura. Este teste inicial foi realizado em duplicata no qual foi injetado uma mistura de ácidos na

concentração 5 mg L^{-1} , na coluna (2). Também foi determinado o tempo morto da coluna nas diferentes proporções experimentadas, foi utilizado o tolueno como marcador de tempo morto e foi injetado no HPLC com detector DAD pois o tolueno não deve ser injetado em detector de espectrometria de massa devido a sua ionização ser dificultada.

Dos cromatogramas obtidos com este teste, extraiu-se as informações de tempo de retenção e fator de retenção (k') para cada analito (Equação 7, consta no item 5.4.3). Porém, houve nesta etapa, muitos resultados negativos para k' e este estudo mostrou que muitos analitos estavam eluindo no tempo morto da coluna, dependendo da proporção de acetonitrila e água ultrapura.

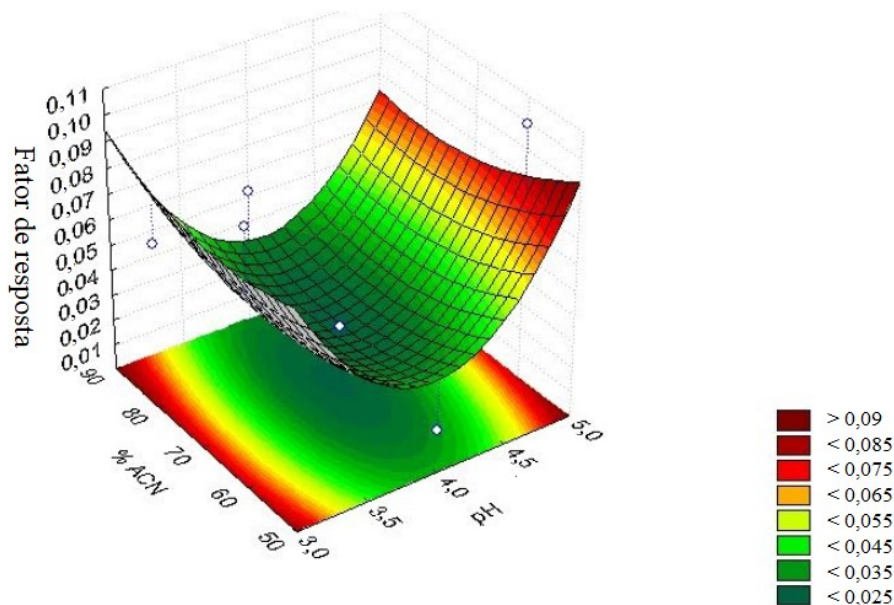
Optou-se por ajustar o pH da fase aquosa em 3, 5 e 5, pois o pH da fase móvel possui um forte impacto na retenção dos compostos em colunas HILIC à base de compostos zwitteriônicos, uma vez que isso influencia na carga de ambos: soluto e fase estacionária. Principalmente em colunas HILIC a base de sílica que são caracterizadas por apresentar uma faixa limitada de estabilidade do pH (pH 2 a 8) e as separações HILIC são aquelas realizadas com fases móveis em faixas de pH de 3 a 8 (TARAJI et al., 2018). Como aditivo químico para o ajuste de pH da água utilizou-se tampão formiato de amônio por ser volátil e não prejudicar o sistema de detecção por espectrometria de massa. Desta forma, optou-se por utilizar um procedimento de otimização multivariada.

Na superfície de resposta (Figura 8), a região em vermelho mostra os pontos onde foram obtidos os maiores valores do fator de resposta (equação 8, item 5.4.3), é chamada de região ótima da superfície e as condições de % de acetonitrila e pH da solução tampão fornecem os melhores resultados. Nas regiões em verde, pode-se observar que a superfície está mais baixa, portanto, foram obtidos valores baixos para o fator de resposta. Estes resultados corroboram com o esperado para o mecanismo HILIC, uma vez que em pH 3, que é o mais baixo possível a maioria dos analitos se encontram neutros, aumentando as interações fase móvel – soluto. Como comentado anteriormente, as interações eletrostáticas entre as duas cargas opostas nas fases estacionárias zwitteriônicas, devido à proximidade entre si, podem enfraquecer as interações eletrostáticas entre analitos carregados e a fase estacionária.

Com isso, a superfície mostrou que as melhores respostas foram obtidas em porcentagem de acetonitrila maiores que 70% e pH próximos a 3. Com isso, fixou-se a fase móvel em acetonitrila: tampão formiato de amônio pH 3 e proporção 75:25 v/v.

Figura 8. Superfície de resposta obtida através do planejamento Doehlert. Mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L^{-1} na coluna (2), temperatura da coluna $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$ e fase móvel acetonitrila: solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).

Superfície plotada; Variáveis: Fator de resposta, 2 fatores, 1 bloco, 9 corridas, Resíduo da média dos quadrados = 0,0007875, $R^2 = 0,71374$, ajuste = 0,23664



ANOVA; Var.:Response; R-sqr= .71374; Adj: .23664 (doehlert correto)					
2 factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=.0007875					
DV: Response					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0.000050	1	0.000050	0.063702	0.817042
pH (Q)	0.005757	1	0.005757	7.310170	0.073553
(2)% ACN(L)	0.000015	1	0.000015	0.018484	0.900468
% ACN(Q)	0.000108	1	0.000108	0.137384	0.735520
1L by 2L	0.000045	1	0.000045	0.057437	0.826035
Error	0.002363	3	0.000788		
Total SS	0.008253	8			

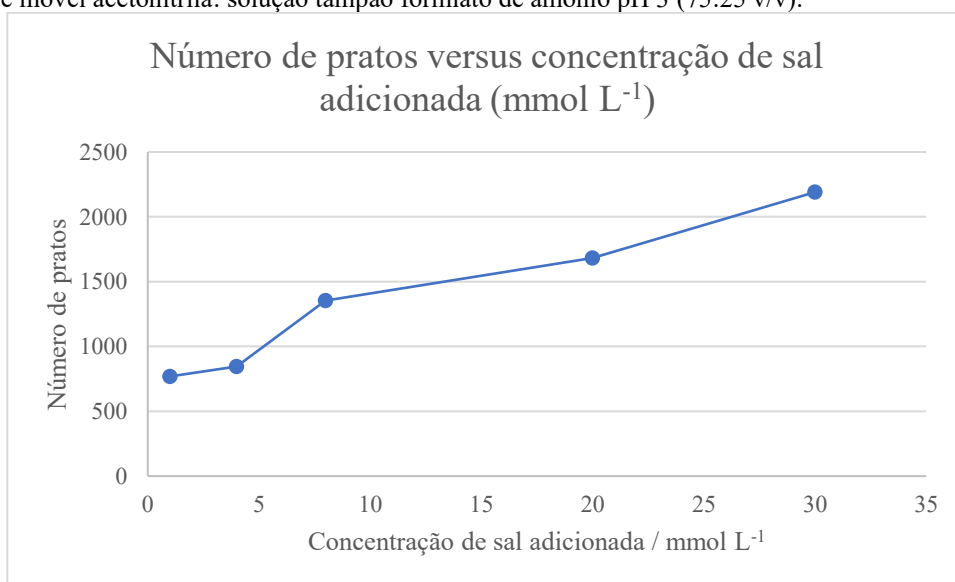
Fonte: Autora.

6.1.4 Efeito da concentração de sais como aditivos na fase móvel

Interações de troca iônica nas fases estacionárias carregadas podem contribuir significativamente para a retenção e seletividade na HILIC. Trabalhos da literatura mostram que a presença de tampões na fase móvel permite controlar as interações eletrostáticas (DELL'AVERSANO; HESS; QUILLIAM, 2005). Os tampões recomendados para HILIC são acetato de amônio e formiato de amônio devido a sua boa solubilidade em fases móveis ricas em solventes orgânicos bem como a sua volatilidade e compatibilidade com o sistema de detecção por espectrometria de massa. O impacto do tipo e da concentração de soluções tampão na retenção de solutos polares tem sido alvo de muitos estudos em HILIC (GUO; GAIKI, 2005); (FISHER, 2014); (BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2010).

Em geral, a presença de aditivo na fase móvel pode aumentar efetivamente as interações eletrostáticas atrativas e repulsivas de analitos carregados com a superfície de colunas HILIC carregadas ou zwitteriônicas. No caso de atrações eletrostáticas, um aumento na concentração do sal resulta na diminuição da retenção de analitos carregados em colunas de carga oposta, enquanto no caso de repulsões eletrostáticas, resulta em maior retenção de analitos carregados em colunas com a mesma carga (GUO; GAIKI, 2005). Um relatório da Thermo Fisher Scientific (FISHER, 2014) descreveu o impacto da concentração de acetato de amônio na separação de uma mistura de ácidos e demonstrou uma redução na retenção dos compostos aniônicos, quando a concentração do sal é aumentada.

Figura 9. Gráfico obtido com estudo do efeito da concentração de sal formiato de amônio na fase móvel aquosa. O gráfico mostra número de pratos versus concentração de sal adicionada. Condições experimentais: mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L^{-1} na coluna (2), temperatura da coluna $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$ e fase móvel acetonitrila: solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).



Fonte: Autora.

No caso deste trabalho, observou-se que para as concentrações de sal formiato de amônio 1 e 4 mmol L^{-1} não houve diferença significativa para tempo de retenção e largura de pico. No entanto, para as demais concentrações de sal adicionadas observou-se aumento em ambos. Esse comportamento mostra a possibilidade de o mecanismo de retenção não acontecer por troca iônica, uma vez que quando há mecanismo de troca iônica ao se aumentar a concentração de sal, diminui a retenção dos analitos (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Com a finalidade de selecionar qual melhor resultado obtido no estudo de concentração de sal adicionada, foi plotado um gráfico da média geométrica dos números de pratos versus concentração de sal adicionada (Figura 9) e pode-se notar que quanto maior a concentração de

sal, maior o número de pratos. E foi feita uma tabela comparando as concentrações de sal adicionadas e o maior tempo de retenção obtido (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação entre concentração de sal formiato de amônio adicionada e tempo de eluição do último analito. Condições experimentais: mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L^{-1} na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC $3.5\mu\text{m}, 100\text{\AA}$ $150 \times 4.6 \text{ mm}$, temperatura da coluna $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ e fase móvel acetonitrila e solução tampão formiato de amônio pH 3 (75:25 v/v).

Concentração de sal adicionada /mmol L⁻¹	Tempo de eluição do último analito
1	11,95
4	12,48
8	14,35
20	17,84
30	19,65

Fonte: Autora.

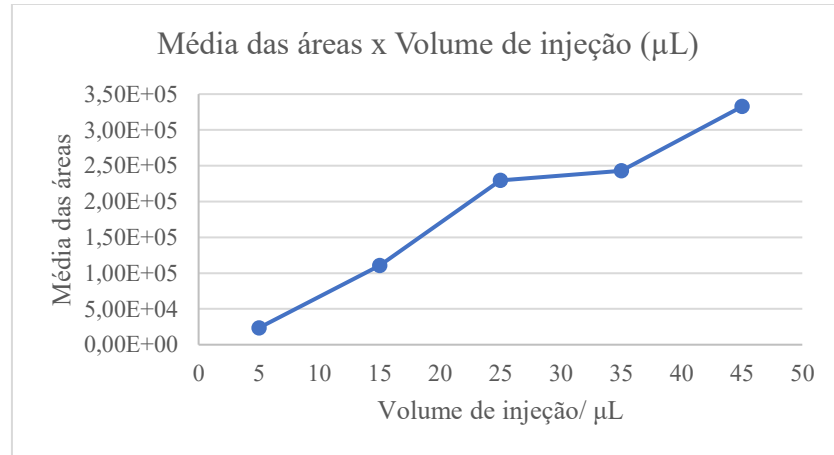
Apesar da Figura 9 mostrar que o uso de maior concentração do tampão forneceu maior número de pratos, optou-se por utilizar concentração de 8 mmol L^{-1} pois nessa condição observou-se uma boa separação entre os analitos com tempos de eluição relativamente baixos.

6.1.5 Estudo do volume de injeção

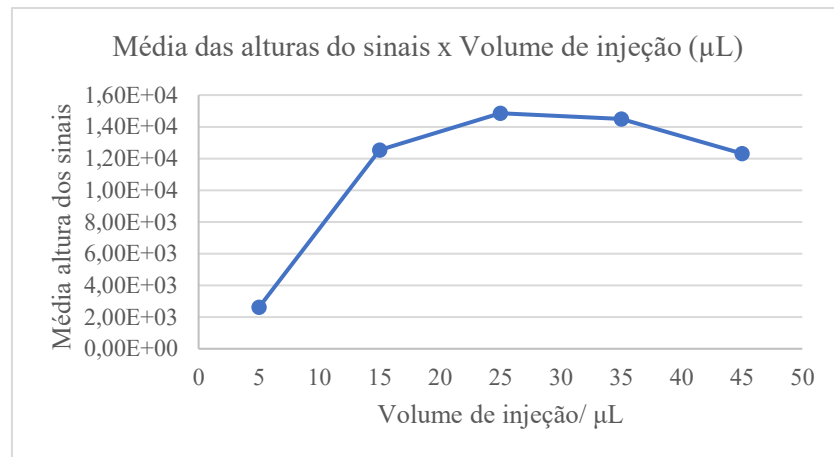
Em virtude da verificação da capacidade da coluna quanto à separação dos compostos em estudo, a última etapa das otimizações do método foi a avaliação do melhor volume de injeção. Foram plotados três gráficos para avaliar qual melhor condição experimental (Figura 10), nos gráficos consta a média geométrica das alturas, das áreas dos sinais, das larguras dos sinais pelo volume de injeção.

Figura 10. Gráficos plotados com os resultados obtidos no estudo de volume de injeção. Gráfico a) média geométrica das áreas dos sinais pelo volume de injeção, b) média geométrica das alturas dos sinais pelo volume de inieção e c) média das larguras dos sinais pelo volume de injeção.

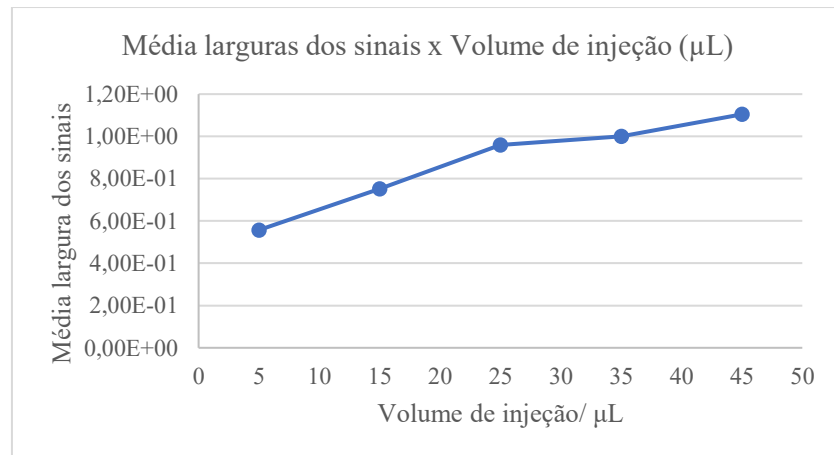
a)



b)



c)



Fonte: Autora.

Os gráficos da Figura 10 mostram que até o volume de injeção 25 μL as áreas cresceram à medida que os volumes de injeção aumentaram e as alturas dos sinais aumentaram, chegaram ao seu valor máximo e começaram a diminuir. Isto aconteceu, porque os sinais ficaram mais

largos, prejudicando a eficiência da separação. Com volume de injeção de 25 μL os sinais já se apresentavam largos e por isso, optou-se por fixar o volume de injeção em 15 μL (e não em 25 μL como seria de se esperar), uma vez que com este volume já foram obtidos sinais detectáveis, com altura e largura de sinal aceitáveis e com uma separação eficiente. Os cromatogramas obtidos nesta etapa da otimização encontram-se no APÊNDICE B.

6.1.6 Seleção do padrão interno para o método

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de padronização interna. Esta técnica é extremamente útil, pois corrige possíveis erros sistemáticos em variáveis experimentais, como temperatura da coluna e volume da amostra.

O padrão interno escolhido foi o ácido mucônico, por ser um composto quimicamente estável, ter estrutura química semelhante aos demais analitos devido ser também um ácido orgânico alifático. Outro fator importante é que ele apresenta tempo de retenção diferente dos demais e principalmente por ser um ácido orgânico sintético, portanto não está presente em nenhuma amostra de alimento.

Na Tabela 10, estão demonstrados os tempos de retenção de todos compostos de interesse deste trabalho.

Tabela 10. Tempos de retenção para os ácidos orgânicos utilizados. Mistura dos ácidos orgânicos em concentração 2 mg L^{-1} na coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5 μm , 100Å 150 x 4.6 mm. Fase móvel acetonitrila e solução tampão formiato de amônio 8 mmol L^{-1} pH 3 (75:25 v/v). Fluxo da fase móvel 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, volume de injeção 15 μL e temperatura da coluna 30 °C.

Analito	Tempo retenção (min)
Acético	5,45
Aminocapróico	9,04
Ascórbico	8,46
Aspártico	4,26
Cetoglutárico	8,50
Fumárico	3,65
Glicólico	7,74
Glucônico	12,34
Glutâmico	8,52
Glutárico	4,26
Isobutírico	4,79
Lático	6,12
Levulínico	4,22
Maleico	4,26
Málico	8,91

Fonte: Autora.

Tabela 10. (continuação)

Analito	Tempo retenção (min)
Malônico	5,50
Mucônico*	6,43
Pirúvico	6,02
Propiônico	5,15
Succínico	5,17

*Padrão interno Fonte: Autora.

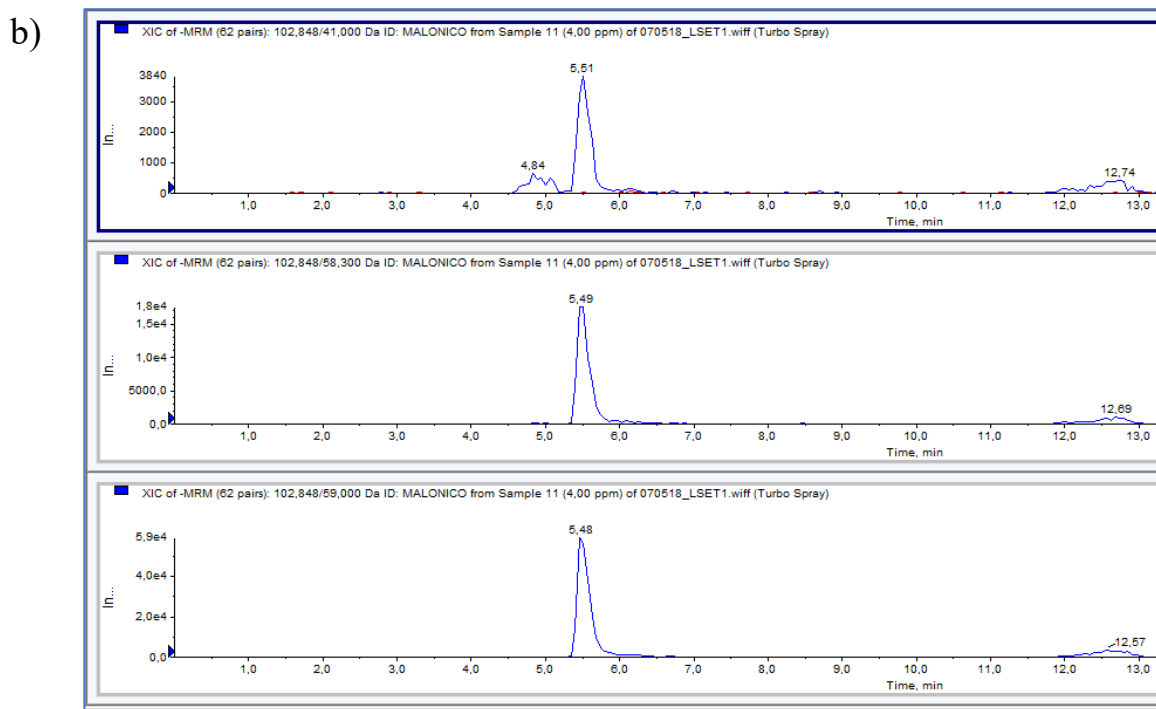
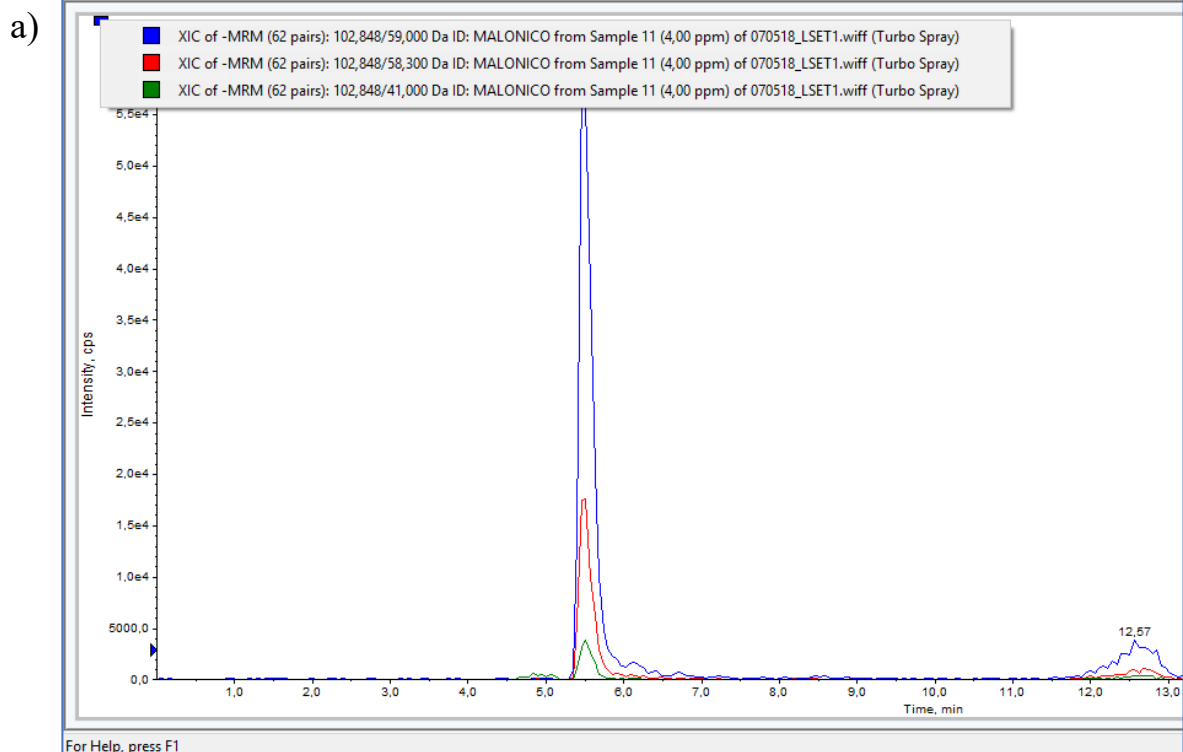
6.2 PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO

Após a otimização das condições experimentais de detecção e separação do método proposto, avaliou-se o seu desempenho para a determinação de ácidos orgânicos através dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação e precisão.

6.2.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro importante, pois afeta os demais parâmetros de mérito do método. A seletividade do método proposto pode ser atrelada ao tipo de detector empregado com o uso do sistema de detecção por espectrometria de massa cada analito apresenta um padrão de fragmentações obtidas por infusão usando o padrão puro individual de cada analito. No espectrômetro de massas triploquadrupolar usado no presente estudo, os íons precursores selecionados no primeiro quadrupolo e seus fragmentos selecionados no terceiro quadrupolo permitem a identificação de cada composto de forma inequívoca, uma vez que as informações sobre as fragmentações dos analitos foram adequadamente obtidas (item 6.6.1). Além disso, a retenção diferencial dos analitos na coluna permite que sejam resolvidos por tempo de eluição. Porém, embora a seletividade possa ser associada ao sistema de detecção, componentes da matriz de uma amostra complexa podem comprometer esse parâmetro de forma que isso influenciará na escolha do tipo de calibração possível de ser usada. Dessa maneira, para complementar a avaliação da seletividade do método e decidir o tipo de calibração a ser empregada deve-se utilizar mais informações comparando as curvas de calibração por padronização interna e por adição de padrão, as quais serão apresentadas e discutidas a seguir. Na Figura 11 constam os sinais da fragmentação do ácido malônico.

Figura 11. Sinais correspondentes da fragmentação do ácido malônico. a) Sinal do ácido malônico após extração dos íons, b) Sinais dos fragmentos separados para ácido malônico.



Fonte: Autora.

Na Figura 11, item (a) constam os sinais da fragmentação sobrepostos do ácido malônico e no item (b) constam os sinais após a extração de cada fragmento separado.

6.2.2 Linearidade

6.2.2.1 Calibração por padronização interna

Para o estudo da linearidade foram preparadas soluções de mistura de padrões em 22 níveis de concentração devido à possibilidade de os ácidos apresentarem distintas faixas lineares. As curvas de calibração foram feitas por padronização interna. Para construir as curvas de calibração foi utilizado o *software Excel*[®]. No mesmo *software* foram feitos os estudos estatísticos com o recurso de análise de dados e regressão linear. Um dos critérios de aceitação foi baseado em gráficos de distribuição de resíduos, os quais não devem apresentar um padrão, isto é, devem ser aleatórios (estão demonstrados no APÊNDICE C). Outro critério adotado foi a análise de variância utilizando as médias quadráticas para avaliar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. Os valores de F tabelados foram consultados de acordo com os resultados de graus de liberdade da regressão e dos resíduos na tabela ANOVA fornecida pelo *software Excel*[®].

Quando o coeficiente angular igual é a zero, ou quando não há relação entre x e y, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas MQ_R e MQ_r , segue uma distribuição F segue uma distribuição F: $\frac{MQ_R}{MQ_r} \approx F_{1,n-2}$ (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).

Onde 1 e n-2 são os números dos graus de liberdade da média quadrática da regressão e da média quadrática residual, respectivamente. Se verificado que $\frac{MQ_R}{MQ_r} > F_{1,n-2}$, descarta-se a possibilidade do coeficiente angular ser igual a zero e tem-se então evidências estatísticas suficientes para a existência de uma relação linear entre as variáveis x e y e quanto maior o valor de $\frac{MQ_R}{MQ_r}$ melhor (BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2010).

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos dados. Os valores de W foram calculados com auxílio do *software Statística 7.0* e os valores obtidos estão na tabela 12. Foi utilizado o nível de significância $\alpha = 0,05$, estabelecendo a hipótese nula H_0 para dados que provém de uma distribuição normal. Caso $W_{\text{calculado}} < W_{\alpha=0,05}$ se rejeita a hipótese nula.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidos pelo método relação sinal/ ruído. Foi determinado pela comparação dos sinais medidos de soluções padrão com baixas concentrações e dos ruídos dos brancos, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com um nível de precisão aceitável. A razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 3:1, proporção geralmente aceita como estimativas do limite de

detecção e maior ou igual a 10:1, proporção geralmente aceita como estimativas do limite de quantificação.

Os dados contidos na Tabela 11 representam os parâmetros analíticos e estatísticos encontrados para cada analito utilizando-se as condições experimentais previamente otimizadas.

Tabela 11. Parâmetros analíticos das curvas de calibração por padronização interna.

	Acético	Aminocapróico	Ascórbico	Aspártico	Cetoglutárico	Fumárico	Glicólico	Glucônico
Faixa calibração (mg L⁻¹)	2,08– 22,83	0,99– 21,78	0,32 – 8,62	0,99–17,82	0,40 – 7,92	0,58– 11,50	1,97– 11,83	1,03 –10,26
Erro padrão	0,0075	0,0410	0,0187	0,0271	0,0401	0,0196	0,0129	0,0864
inclinação (L mg⁻¹)	0,0102	0,1176	1,6232	0,0692	1,1088	0,0768	0,0507	0,3146
erro padrão inclinação	0,0004	0,0018	0,0025	0,0017	0,0056	0,0017	0,0016	0,0108
Intercepto	0,0393	0,1067	-0,1811	0,0196	-0,2653	-0,0031	-0,0372	-0,1615
erro padrão intercepto	0,0052	0,0229	0,0099	0,0164	0,0248	0,0103	0,0120	0,0672
coeficiente determinação (R²)	0,9930	0,9983	0,9999	0,9966	0,9999	0,9966	0,9962	0,9953
Limite detecção LD (mg L⁻¹)	0,48	0,25	0,04	0,29	0,12	0,31	0,63	0,06
Limite quantificação LQ (mg L⁻¹)	1,45	0,76	0,12	0,87	0,36	0,94	1,90	0,19
F tabelado	6,61	5,591	7,7100	5,9870	10,1300	5,5910	7,709	7,7100
F obtido	713,1190	4105,235	4953,3707	1738,0020	39467,5353	2063,975	1059,7110	848,3797
W_{calculado}	0,9411	0,9010	0,7390	0,9152	0,9590	0,8852	0,9791	0,9443
W_{α=0,05}	0,8030	0,8290	0,7880	0,8180	0,7620	0,8290	0,7880	0,7880

Fonte: Autora.

Tabela 11. (continuação)

	Glutâmico	Glutárico	Isobutírico	Lático	Levulínico	Maleico	Málico
Faixa de calibração (mg L⁻¹)	2,03– 16,22	0,61– 16,16	0,81– 12,07	0,97– 15,50	0,38 – 21,08	0,10 – 11,93	0,49 – 15,65
Erro padrão	0,0966	0,2277	0,2707	0,0266	1,8639	2,8774	0,0970
inclinação (L mg⁻¹)	0,2686	1,0628	1,1698	0,1259	3,4747	6,8519	0,2340
erro padrão inclinação	0,0082	0,0142	0,0240	0,0023	0,0799	0,2131	0,0056
Intercepto	-0,2647	0,1653	-0,2392	0,0364	6,7254	5,2885	-0,0884
erro padrão intercepto	0,0771	0,1127	0,1531	0,0173	0,8611	1,3155	0,0966
coeficiente determinação (R²)	0,9963	0,9988	0,9975	0,9987	0,9974	0,9942	0,9954
Limite detecção LD (mg L⁻¹)	0,43	0,16	0,06	0,29	0,01	0,01	0,10
Limite quantificação LQ (mg L⁻¹)	1,28	0,48	0,19	0,89	0,04	0,01	0,29
F tabelado	7,709	5,5910	5,9870	7,709	6,6080	5,9870	5,3180
F obtido	1081,5900	5620,9585	2377,4465	3119,1970	1893,4030	1033,6900	1733,6310
W_{calculado}	0,9333	0,8739	0,9178	0,8713	0,6699	0,7578	0,8437
W_{α=0,05}	0,7880	0,8290	0,8180	0,7880	0,8030	0,8180	0,8420

Fonte: Autora.

Tabela 11. (continuação)

	Malônico	Pirúvico	Propiônico	Succínico
Faixa de calibração (mg L⁻¹)	0,2091 – 6,2726	0,5198 – 12,4740	0,9009 – 13,5135	1,0230 – 16,3680
Erro padrão	0,1911	0,0171	0,0255	0,6514
inclinação (L mg⁻¹)	1,5839	0,0969	0,0749	1,3464
erro padrão inclinação	0,0316	0,0014	0,0020	0,0470
Intercepto	0,2638	0,0341	0,0550	2,4860
erro padrão intercepto	0,0798	0,0097	0,0154	0,4481
coeficiente determinação (R²)	0,9968	0,9988	0,9957	0,9951
Limite detecção LD (mg L⁻¹)	0,04	0,10	0,24	0,11
Limite quantificação LQ (mg L⁻¹)	0,12	0,29	0,73	0,32
F tabelado	5,3180	5,9870	5,9870	7,7090
F obtido	2519,9455	4905,0491	1373,420835	820,3759
W_{calculado}	0,7321	0,8949	0,9432	0,9228
W_{α=0,05}	0,8420	0,8180	0,8180	0,7880

Fonte: Autora.

De acordo com a Tabela 11, pode-se perceber que cada analito apresentou uma faixa de calibração diferente. Os valores de erro padrão da faixa linear, inclinação e intercepto foram significativamente baixos. Os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram resultados satisfatórios uma vez que todos maiores que 0,99. Os limites de detecção variaram de 0,01 a 0,63 mg L⁻¹ e os limites de quantificação variaram de 0,01 a 1,90 mg L⁻¹.

Para todos os ácidos foi confirmada uma relação linear, uma vez que todos os valores F obtidos foram maiores do que os F tabelados. Porém, para os ácidos ascórbico, levulínico, maleico e malônico, os quais apresentam $W_{\text{calculado}} < W_{\alpha=0,05}$, se rejeita a hipótese nula H_0 e os dados não provêm de uma distribuição normal. Para os demais ácidos, os dados provêm de uma distribuição normal. Em relação aos gráficos de distribuição dos resíduos das regressões (APÊNDICE C) todos demonstraram pontos dispersos, sendo assim os resíduos são independentes da concentração.

6.2.2.2 Calibração por adição de padrão usando padrão interno

Depois de obtidas as linearidades a partir das calibrações por padronização interna, foi realizado o estudo de efeito de matriz usando calibração por adição de padrão. Foram escolhidas cinco matrizes alimentícias: vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte. Primeiramente, foram injetadas as amostras sem fortificação, apenas diluídas para verificar quais os ácidos estavam presentes nas diferentes matrizes e pelas áreas obtidas prever quais as diluições adequadas.

Depois de verificadas as áreas e comparando-as com as curvas de calibração obtidas na linearidade, foram decididas as diluições utilizadas: vinagre diluído 50 e 200 vezes, vinho 100 e 500 vezes, cerveja 10 e 100 vezes, suco de laranja 100 e 500 vezes e iogurte 30 e 250 vezes. Essas matrizes foram fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos descritas no item 5.1.4.

Para todos os analitos procurou-se comparar os coeficientes angulares das curvas de adição de padrão da amostra com aqueles obtidos com a padronização interna. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12. Equações das curvas de calibração por padronização interna e por adição de padrão obtidas nas diferentes matrizes alimentícias e em diferentes diluições.

Analito	Equação da curva da padronização interna	Equação curva adição vinagre diluído 50x e 200x	Equação curva adição vinho diluído 100x e 500x	Equação curva adição cerveja diluída 10x e 100x	Equação curva adição suco diluído 100x e 500x	Equação curva adição iogurte diluído 30x e 250x
Acético	$y = 0,0102x + 0,0393$ $R^2 = 0,9930$	$y = 0,0140x + 0,0054$ $R^2 = 0,972$	$y = 0,0089x - 0,0131$ $R^2 = 0,9506$	$y = 0,0223x - 0,0222$ $R^2 = 0,9981$	$y = 0,0066x - 0,0023$ $R^2 = 0,978$	$y = 0,0108x - 0,0033$ $R^2 = 0,9891$
		$y = 0,0081x + 0,0048$ $R^2 = 0,9727$	$y = 0,0045x - 0,0052$ $R^2 = 0,9862$	$y = 0,0088x - 0,0157$ $R^2 = 0,9323$	$y = 0,0072x - 0,0083$ $R^2 = 0,8996$	$y = 0,0054x - 0,005$ $R^2 = 0,941$
Aminocapróico	$y = 0,1176x + 0,1067$ $R^2 = 0,9983$	$y = 0,1339x + 1,1997$ $R^2 = 0,9982$	$y = 0,0718x + 0,3679$ $R^2 = 0,9848$	$y = 0,2793x + 0,7327$ $R^2 = 0,9527$	$y = 0,0619x - 0,0185$ $R^2 = 0,9629$	$y = 0,0399x - 0,0171$ $R^2 = 0,9714$
		$y = 0,2625x + 0,0476$ $R^2 = 0,9615$	$y = 0,0669x + 0,0166$ $R^2 = 0,9868$	$y = 0,0376x + 0,0449$ $R^2 = 0,9404$	$y = 0,0702x - 0,083$ $R^2 = 0,9972$	$y = 0,0112x + 0,0511$ $R^2 = 0,9654$
Ascórbico	$y = 1,6232x - 0,1811$ $R^2 = 0,9999$	$y = 0,0152x - 0,0067$ $R^2 = 0,8097$	$y = 0,384x - 0,0444$ $R^2 = 0,9854$	$y = 0,5478x - 0,2273$ $R^2 = 0,992$	$y = 0,1933x + 0,9963$ $R^2 = 0,9923$	$y = 0,2766x - 0,0583$ $R^2 = 0,9915$
		$y = 0,0554x + 0,0122$ $R^2 = 0,9695$	$y = 0,195x - 0,0602$ $R^2 = 0,9548$	$y = 0,4403x + 0,259$ $R^2 = 0,9844$	$y = 10,688x + 8,6559$ $R^2 = 0,7695$	$y = 0,2588x - 0,2226$ $R^2 = 0,9513$
Aspártico	$y = 0,0692x + 0,0196$ $R^2 = 0,9957$	$y = 0,1301x - 0,0152$ $R^2 = 0,9827$	$y = 0,052x - 0,0281$ $R^2 = 0,9845$	$y = 0,0735x - 0,1035$ $R^2 = 0,9801$	$y = 0,0492x - 0,0832$ $R^2 = 0,9123$	$y = 0,0457x - 0,0489$ $R^2 = 0,9905$
		$y = 0,0669x - 0,0064$ $R^2 = 0,9971$	$y = 0,0433x - 0,0705$ $R^2 = 0,9696$	$y = 0,0494x - 0,0843$ $R^2 = 0,9547$	$y = 0,0542x - 0,0938$ $R^2 = 0,9493$	$y = 0,0346x - 0,0446$ $R^2 = 0,989$
Cetoglutárico	$y = 1,1088x - 0,2653$ $R^2 = 0,9999$	$y = 0,7115x + 0,4632$ $R^2 = 0,9983$	$y = 0,2476x - 0,1644$ $R^2 = 0,9754$	$y = 0,2613x - 0,4666$ $R^2 = 0,9347$	$y = 0,2449x - 0,4644$ $R^2 = 0,8999$	$y = 0,0732x - 0,1358$ $R^2 = 0,9134$
		$y = 0,4448x - 0,0368$ $R^2 = 0,9969$	$y = 0,2505x - 0,3862$ $R^2 = 0,9749$	$y = 0,1432x + 0,2795$ $R^2 = 0,6283$	$y = 0,1392x + 0,2148$ $R^2 = 0,7581$	$y = 0,0442x - 0,0747$ $R^2 = 0,9584$

*Número médio de níveis adicionados, n=4.

Tabela 12. (continuação)

Analito	Equação da curva da padronização interna	Equação curva adição vinagre diluído 50x e 200x	Equação curva adição vinho diluído 100x e 500x	Equação curva adição cerveja diluído 10x e 100x	Equação curva adição suco diluído 100x e 500x	Equação curva adição iogurte diluído 30x e 250x
Fumárico	$y = 0,0768x - 0,0031$ $R^2 = 0,9966$	$y = 0,0562x + 0,0502$ $R^2 = 0,9973$	$y = 0,0457x - 0,0234$ $R^2 = 0,981$	$y = 0,0358x - 0,0134$ $R^2 = 0,9884$	$y = 0,0405x - 0,0037$ $R^2 = 0,9995$	$y = 0,0416x - 0,0267$ $R^2 = 0,9664$
		$y = 0,0420x + 0,0057$ $R^2 = 0,9995$	$y = 0,0384x - 0,0223$ $R^2 = 0,9827$	$y = 0,0425x - 0,1139$ $R^2 = 0,9208$	$y = 0,0454x - 0,108$ $R^2 = 0,9475$	$y = 0,0387x - 0,056$ $R^2 = 0,9723$
Glicólico	$y = 0,0507x - 0,0372$ $R^2 = 0,9962$	$y = 0,0571x + 0,0386$ $R^2 = 0,9983$	$y = 0,0325x - 0,0074$ $R^2 = 0,9968$	$y = 0,0372x - 0,0051$ $R^2 = 0,9971$	$y = 0,0156x + 0,013$ $R^2 = 0,9853$	$y = 0,041x + 0,022$ $R^2 = 0,9604$
		$y = 0,0452x + 0,0087$ $R^2 = 0,999$	$y = 0,026x + 0,0036$ $R^2 = 0,9929$	$y = 0,0242x - 0,0379$ $R^2 = 0,9773$	$y = 0,0223x - 0,009$ $R^2 = 0,9876$	$y = 0,0315x - 0,0001$ $R^2 = 0,9992$
Glutárico	$y = 1,0628x + 0,1653$ $R^2 = 0,9988$	$y = 1,0863x + 0,2034$ $R^2 = 0,9985$	$y = 0,6949x - 0,4378$ $R^2 = 0,9645$	$y = 0,9766x - 0,8617$ $R^2 = 0,9497$	$y = 0,7831x - 0,9886$ $R^2 = 0,9786$	$y = 0,5459x - 0,3117$ $R^2 = 0,9677$
		$y = 0,9919x + 0,0255$ $R^2 = 0,9998$	$y = 0,724x - 0,7897$ $R^2 = 0,9971$	$y = 0,6667x - 0,5341$ $R^2 = 0,8869$	$y = 0,9589x - 2,251$ $R^2 = 0,9719$	$y = 0,4844x - 0,3685$ $R^2 = 0,929$
Lático	$y = 0,1259x + 0,0364$ $R^2 = 0,9987$	$y = 0,1187x + 1,8163$ $R^2 = 0,9857$	$y = 0,2214x + 0,1136$ $R^2 = 0,9926$	$y = 0,1342x + 0,2656$ $R^2 = 0,9893$	$y = -0,081x + 0,9184$ $R^2 = 0,1934$	$y = 0,3818x + 11,505$ $R^2 = 0,148$
		$y = 0,1265x + 0,3574$ $R^2 = 0,9962$	$y = 0,0519x + 0,1247$ $R^2 = 0,912$	$y = 0,1166x - 0,2807$ $R^2 = 0,9698$	$y = 0,0204x + 0,0509$ $R^2 = 0,9254$	$y = 0,1586x + 0,512$ $R^2 = 0,9646$
Levulínico	$y = 1,8639x + 6,7254$ $R^2 = 0,9974$	$y = 0,2799x + 0,3703$ $R^2 = 0,9991$	$y = 0,2145x - 0,0879$ $R^2 = 0,9878$	$y = 0,2793x - 0,142$ $R^2 = 0,9843$	$y = 0,2152x - 0,2823$ $R^2 = 0,905$	$y = 0,2091x - 0,2813$ $R^2 = 0,9764$
		$y = 0,2254x + 0,032$ $R^2 = 0,9988$	$y = 0,1696x - 0,1987$ $R^2 = 0,9892$	$y = 0,1984x - 0,5186$ $R^2 = 0,934$	$y = 0,2286x - 0,5581$ $R^2 = 0,9648$	$y = 0,1601x - 0,09$ $R^2 = 0,9608$
Maleico	$y = 6,8519x + 5,2885$ $R^2 = 0,9957$	$y = 8,3198x + 8,7731$ $R^2 = 0,9532$	$y = 4,2718x + 1,3083$ $R^2 = 0,9964$	$y = 5,5766x + 4,6641$ $R^2 = 0,9605$	$y = 2,8608x + 0,6069$ $R^2 = 0,9964$	$y = 4,5292x + 1,7133$ $R^2 = 0,9936$
		$y = 5,9528x + 4,2196$ $R^2 = 0,978$	$y = 3,9154x + 2,9428$ $R^2 = 0,9714$	$y = 4,0741x - 0,251$ $R^2 = 0,996$	$y = 3,4715x + 2,4427$ $R^2 = 0,9635$	$y = 3,9859x + 1,461$ $R^2 = 0,9815$

Tabela 12. (continuação)

Analito	Equação da curva da padronização interna	Equação curva adição vinagre diluído 50x e 200x	Equação curva adição vinho diluído 100x e 500x	Equação curva adição cerveja diluído 10x e 100x	Equação curva adição suco diluído 100x e 500x	Equação curva adição iogurte diluído 30x e 250x
Málico	$y = 0,2340x - 0,0884$ $R^2 = 0,9954$	$y = 0,2799x + 3,6179$ $R^2 = 0,6711$	$y = 0,1159x - 0,1203$ $R^2 = 0,9013$	$y = 0,1643x - 0,4465$ $R^2 = 0,9119$	$y = 0,2529x - 0,6879$ $R^2 = 0,9113$	$y = 0,0362x - 0,0671$ $R^2 = 0,9996$
		$y = 0,2305x + 0,392$ $R^2 = 0,9912$	$y = 0,1224x - 0,2939$ $R^2 = 0,9571$	$y = 0,0669x + 0,1064$ $R^2 = 0,5162$	$y = 0,1066x + 0,0708$ $R^2 = 0,7913$	$y = 0,0185x - 0,0447$ $R^2 = 0,9693$
Malônico	$y = 1,5839x + 0,2638$ $R^2 = 0,9968$	$y = 3,0425x + 0,0053$ $R^2 = 0,9845$	$y = 1,1144x - 0,6251$ $R^2 = 0,9694$	$y = 1,9501x - 1,7351$ $R^2 = 0,9259$	$y = 0,815x - 1,2969$ $R^2 = 0,9693$	$y = 1,0619x - 0,7048$ $R^2 = 0,9691$
		$y = 1,686x - 0,2202$ $R^2 = 0,9985$	$y = 0,628x - 0,4504$ $R^2 = 0,9439$	$y = 0,8114x - 2,1656$ $R^2 = 0,9226$	$y = 0,5365x - 0,5284$ $R^2 = 0,8951$	$y = 0,6789x - 0,8817$ $R^2 = 0,9844$
Pirúvico	$y = 0,0978x + 0,0065$ $R^2 = 0,9989$	$y = 0,1495x + 0,4456$ $R^2 = 0,9695$	$y = 0,0514x + 0,3894$ $R^2 = 0,991$	$y = 0,094x - 0,0787$ $R^2 = 0,9474$	$y = 0,0432x + 0,2281$ $R^2 = 0,961$	$y = 0,629x + 0,7535$ $R^2 = 0,8998$
		$y = 0,082x + 0,0496$ $R^2 = 0,9956$	$y = 0,049x - 0,0038$ $R^2 = 0,9525$	$y = 0,0875x - 0,2199$ $R^2 = 0,9529$	$y = 0,012x + 0,0771$ $R^2 = 0,6015$	$y = 0,307x - 0,1215$ $R^2 = 0,9415$
Propiônico	$y = 0,0656x + 0,0673$ $R^2 = 0,9969$	$y = 0,0154x + 0,2972$ $R^2 = 0,8904$	$y = 0,0299x + 0,0233$ $R^2 = 0,8208$	$y = 0,0485x + 0,0943$ $R^2 = 0,7244$	$y = 0,0287x - 0,0736$ $R^2 = 0,944$	$y = 0,0104x - 0,0179$ $R^2 = 0,9862$
		$y = 0,013x + 0,1152$ $R^2 = 0,992$	$y = 0,024x - 0,0233$ $R^2 = 0,9451$	$y = 0,0205x - 0,046$ $R^2 = 0,9887$	$y = 0,105x + 0,035$ $R^2 = 0,8167$	$y = 0,0117x - 0,0247$ $R^2 = 0,998$
Succínico	$y = 1,3464x + 2,4860$ $R^2 = 0,9951$	$y = 0,2431x + 6,9234$ $R^2 = 0,8335$	$y = 0,2323x + 5,4233$ $R^2 = 0,781$	$y = 1,1366x - 2,9853$ $R^2 = 0,9314$	$y = 0,513x - 0,4608$ $R^2 = 0,9308$	$y = 0,239x - 0,4133$ $R^2 = 0,9864$
		$y = 0,3603x + 1,3243$ $R^2 = 0,9558$	$y = 0,8328x - 1,7539$ $R^2 = 0,9979$	$y = 0,477x - 1,1184$ $R^2 = 0,9782$	$y = 0,2594x + 1,0768$ $R^2 = 0,6272$	$y = 0,1706x + 0,4658$ $R^2 = 0,5379$

Fonte: Autora.

Para os ácidos acético, glucônico, glutâmico e isobutírico foram obtidos alguns resultados com baixa correlação linear, principalmente para as amostras cerveja, suco e iogurte nas condições mais diluídas. Isso pode ter acontecido porque foram as amostras injetadas por último, devido a utilização de injetor automático e eram muitas amostras, estas que ficaram por último demoraram mais de 24 horas para serem injetadas.

Em relação aos resultados obtidos, três observações são importantes de serem ressaltadas. A primeira é que de forma geral, as equações de adição de padrão obtidas para o vinagre diluído 200 vezes foram as que apresentaram menores diferenças entre os coeficientes angulares obtidos, destacando-se os ácidos: acético, aspártico, glicólico, glutárico, lático, maleico, málico, malônico e pirúvico. Para os ácidos aspártico e lático, as diferenças entre os coeficientes angulares foram menores do que o erro padrão da inclinação da curva externa. Portanto, o vinagre diluído 200 vezes foi a amostra que obteve menor efeito de matriz dentre todas as soluções testadas. Para o vinagre diluído 50 vezes, não houve um significativo efeito de matriz para os ácidos aminocapróico, glicólico, glutárico, lático e málico. Porém, apenas para o ácido lático a diferença entre os coeficientes angulares foi menor do que o erro padrão da inclinação da curva externa.

Para as soluções fortificadas de suco de laranja, os resultados obtidos de calibração por adição de padrão estão muito distintos em relação aos coeficientes angulares da padronização interna, o que indica que o suco de laranja apresenta efeito de matriz. No entanto, estes coeficientes não apresentaram muita diferença entre si ao se comparar as diluições 100x e 500x, para os ácidos acético, aminocapróico, aspártico, fumárico, glicólico e levulínico. Isso mostra que a diluição não apresentou muita diferença no caso desta matriz.

Por fim, para alguns ácidos observou-se que os coeficientes angulares obtidos para as amostras foram muito diferentes daqueles presentes na padronização interna, mas se forem comparados os resultados de todas as matrizes entre si, eles estão muito próximos. Pode-se destacar este comportamento para o ácido cetoglutárico, ao se comparar os resultados obtidos nas equações de reta do vinho diluído 100 e 500 vezes, cerveja diluída 10 vezes e suco de laranja diluído 100 vezes.

Variações de inclinação de até 10 % são aceitáveis. Foram obtidas variações de *slope* aceitáveis em pelo menos uma das dez equações de adição de padrão para os analitos: acético, aspártico, glutárico, lático, málico, malônico e pirúvico. No entanto, a maioria dos ácidos apresentou variações maiores de 10 % em todas as equações obtidas. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a calibração ideal a ser feita para a

quantificação dos analitos nas amostras de interesse é por adição de padrão em todos os casos.

6.3 EXATIDÃO

Os resultados médios obtidos através de testes de recuperação dos ácidos orgânicos em três níveis de concentração adicionados nas amostras de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte, estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13. Percentual de recuperação para o método desenvolvido, avaliado em três níveis de concentração, com cinco diferentes matrizes, fortificadas com mistura dos padrões de ácidos orgânicos.

Matriz	Concentração Adicionada / mg L⁻¹	Acético	Aminocapróico	Ascórbico	Aspártico	Cetoglutárico	Fumárico	Glicólico
Vinagre	1	98,54 ± 13,03	114,81 ± 42,79	131,33 ± 18,48	62,91 ± 22,74	79,93 ± 14,09	135,54 ± 12,00	91,81 ± 16,31
	2	118,58 ± 11,38	100,53 ± 10,79	52,05 ± 15,85	86,71 ± 17,15	88,59 ± 9,43	113,76 ± 11,03	79,11 ± 26,18
	4	106,19 ± 10,57	91,09 ± 6,57	123,77 ± 29,03	95,25 ± 26,79	70,82 ± 5,30	108,54 ± 1,87	99,89 ± 12,24
Vinho	1	84,15 ± 19,23	118,12 ± 17,05	135,13 ± 12,89	105,59 ± 19,74	132,10 ± 1,89	94,53 ± 11,44	77,69 ± 4,25
	2	53,53 ± 21,02	98,93 ± 21,90	97,30 ± 15,64	96,31 ± 5,61	147,12 ± 6,48	91,45 ± 12,75	85,81 ± 32,44
	4	80,69 ± 17,11	85,74 ± 4,12	49,65 ± 15,41	71,66 ± 18,37	121,59 ± 13,34	88,30 ± 8,25	95,19 ± 8,69
Cerveja	1	159,41 ± 10,32	145,77 ± 1,51	121,25 ± 18,41	82,09 ± 5,02	57,67 ± 9,98	67,71 ± 18,02	61,93 ± 38,04
	2	131,68 ± 8,21	97,57 ± 17,73	150,22 ± 9,14	66,97 ± 3,59	80,89 ± 11,23	80,17 ± 32,04	44,67 ± 23,12
	4	130,20 ± 6,42	60,25 ± 4,13	117,60 ± 11,06	79,40 ± 9,27	106,60 ± 7,60	84,95 ± 24,13	87,69 ± 3,61
Suco de laranja	1	46,45 ± 12,45	123,16 ± 13,89	115,32 ± 24,74	94,37 ± 7,26	62,14 ± 13,55	97,74 ± 19,58	92,69 ± 17,25
	2	42,79 ± 13,11	75,13 ± 12,03	82,57 ± 1,39	40,69 ± 10,60	108,83 ± 49,15	82,43 ± 15,66	83,51 ± 6,53
	4	73,46 ± 12,56	86,62 ± 11,60	99,85 ± 2,57	49,67 ± 12,35	125,48 ± 11,09	127,40 ± 20,11	138,92 ± 15,22
Iogurte	1	65,78 ± 20,87	83,67 ± 21,23	117,56 ± 4,78	80,99 ± 20,81	55,82 ± 6,23	109,40 ± 41,37	109,26 ± 12,39
	2	97,12 ± 18,92	64,59 ± 39,59	101,45 ± 22,59	64,83 ± 13,29	80,79 ± 26,04	96,47 ± 9,14	112,06 ± 26,68
	4	95,85 ± 15,03	67,21 ± 16,24	124,30 ± 15,26	77,65 ± 10,48	77,85 ± 13,77	94,04 ± 24,87	88,58 ± 18,18

Tabela 13. (continuação)

Matriz	Concentração Adicionada / mg L⁻¹	Glucônico	Glutâmico	Glutárico	Isobutírico	Lático	Levulínico
Vinagre	1	112,72 ± 11,05	101,11 ± 9,23	119,84 ± 16,34	112,14 ± 13,81	108,28 ± 12,03	86,69 ± 25,85
	2	98,65 ± 11,28	86,00 ± 12,48	121,56 ± 12,69	118,05 ± 3,34	126,00 ± 16,78	89,04 ± 15,19
	4	88,26 ± 11,23	101,02 ± 5,12	108,20 ± 10,62	96,31 ± 8,34	109,07 ± 2,51	86,36 ± 11,54
Vinho	1	103,92 ± 13,7	97,55 ± 7,43	115,28 ± 33,62	78,94 ± 17,33	105,70 ± 6,55	84,11 ± 3,86
	2	100,76 ± 21,6	57,91 ± 30,58	108,83 ± 18,20	61,54 ± 11,81	93,99 ± 15,93	96,75 ± 10,46
	4	96,21 ± 13,1	91,40 ± 24,26	111,55 ± 6,69	129,71 ± 29,08	98,10 ± 8,24	85,98 ± 24,23
Cerveja	1	92,12 ± 22,6	99,99 ± 20,71	73,31 ± 14,84	104,28 ± 20,49	82,49 ± 37,69	90,67 ± 17,59
	2	95,89 ± 13,7	92,03 ± 17,65	84,52 ± 18,59	74,81 ± 15,71	75,98 ± 12,89	119,20 ± 25,47
	4	114,28 ± 2,9	89,45 ± 33,94	84,99 ± 4,08	111,96 ± 5,20	115,58 ± 14,96	130,50 ± 16,02
Suco de laranja	1	112,29 ± 5,41	81,12 ± 20,55	74,53 ± 10,07	146,76 ± 1,45	91,91 ± 17,49	60,18 ± 13,57
	2	64,10 ± 3,13	115,04 ± 27,42	91,74 ± 9,74	65,33 ± 10,84	101,35 ± 19,92	94,38 ± 11,75
	4	104,18 ± 12,81	69,77 ± 16,53	92,81 ± 17,26	106,57 ± 6,75	79,20 ± 4,23	88,51 ± 16,98
Iogurte	1	79,16 ± 3,21	111,71 ± 13,39	73,06 ± 10,25	75,28 ± 14,87	87,06 ± 9,52	74,85 ± 31,41
	2	106,59 ± 8,95	116,80 ± 21,84	66,20 ± 21,99	99,09 ± 18,61	116,92 ± 15,72	93,26 ± 6,95
	4	63,35 ± 22,16	95,83 ± 26,09	97,90 ± 34,86	110,85 ± 4,08	136,86 ± 21,97	107,97 ± 23,76

Tabela 13. (continuação)

Matriz	Concentração Adicionada / mg L⁻¹	Maleico	Málico	Malônico	Pirúvico	Propiônico	Succínico
Vinagre	1	132,41 ± 23,68	123,62 ± 14,39	86,40 ± 9,37	113,80 ± 12,83	84,70 ± 17,27	84,09 ± 16,04
	2	120,05 ± 13,20	119,69 ± 14,59	89,12 ± 13,90	92,50 ± 15,60	110,42 ± 11,68	114,47 ± 14,90
	4	106,23 ± 18,68	110,46 ± 27,87	100,57 ± 18,04	110,35 ± 19,23	115,79 ± 10,36	120,28 ± 6,95
Vinho	1	93,49 ± 17,54	72,98 ± 11,75	139,43 ± 12,03	101,85 ± 5,22	114,16 ± 8,47	66,71 ± 13,13
	2	85,04 ± 12,75	79,78 ± 14,07	138,68 ± 15,64	112,75 ± 3,48	109,86 ± 12,56	114,90 ± 15,38
	4	68,03 ± 28,43	132,86 ± 31,99	150,65 ± 4,98	96,46 ± 9,27	103,19 ± 18,02	90,94 ± 12,99
Cerveja	1	92,44 ± 19,04	95,55 ± 14,23	120,23 ± 11,06	79,09 ± 7,65	108,76 ± 15,66	45,13 ± 23,44
	2	106,25 ± 3,78	83,65 ± 5,94	88,77 ± 9,14	93,45 ± 10,65	78,54 ± 4,25	76,45 ± 4,13
	4	100,66 ± 9,87	68,49 ± 4,71	90,90 ± 5,39	68,99 ± 12,34	155,05 ± 8,69	60,23 ± 17,32
Suco de laranja	1	106,09 ± 12,91	79,50 ± 6,99	105,73 ± 7,57	94,14 ± 20,86	43,15 ± 17,25	86,83 ± 6,78
	2	88,23 ± 10,23	51,51 ± 11,94	111,32 ± 22,89	128,56 ± 1,89	88,41 ± 3,61	84,99 ± 11,64
	4	72,75 ± 8,18	47,42 ± 2,51	82,09 ± 15,64	93,89 ± 9,98	88,19 ± 15,22	137,92 ± 29,30
Iogurte	1	107,35 ± 4,57	53,00 ± 7,65	78,67 ± 19,74	82,40 ± 11,24	79,97 ± 12,39	123,98 ± 9,24
	2	131,18 ± 8,09	82,88 ± 16,10	103,32 ± 18,37	70,72 ± 7,65	86,47 ± 18,78	111,34 ± 16,89
	4	102,29 ± 21,56	128,58 ± 17,77	85,03 ± 4,63	46,99 ± 13,45	65,67 ± 2,91	85,93 ± 11,46

Fonte: Autora.

Para o método desenvolvido e aplicado, de forma geral, as recuperações variaram de 40,69 a 159,41 %. Na matriz de vinagre, as recuperações foram de 52,05 (ascórbico) a 135,54 (fumárico) %. Na matriz de vinho, foram obtidas recuperações de 49,65 (ascórbico) a 150,65 (malônico) %. Na matriz de cerveja, obtiveram-se valores de 44,67 (glicólico) a 159,41 (acético) % de recuperação. Na matriz de suco de laranja, as recuperações variaram de 40,69 (aspártico) a 146,76 (isobutírico) %. Por fim, na matriz de iogurte, as recuperações obtidas foram de 46,99 (pirúvico) a 136,86 (lático) %.

A AOAC (2016) considera valores de recuperação entre 80 e 110 % como aceitáveis, para analitos presentes nas amostras em níveis de mg L^{-1} . Os analitos ácidos fumárico, glicólico, glutâmico, levulínico e maleico foram os que obtiveram maior número de valores aceitáveis. Além disso, para as matrizes de vinagre e vinho, foram obtidos os resultados de recuperações mais adequados, como é possível observar na Tabela 13.

6.4 PRECISÃO

Após o ensaio de exatidão, foi avaliada a precisão dos resultados obtidos no estudo de efeito de matriz. Em virtude da grande quantidade de matrizes e resultados obtidos no estudo, optou-se por avaliar a precisão intra e inter-ensaio apenas para a matriz de vinagre. Foram avaliados os tempos de retenção e as áreas dos sinais dos cromatogramas injetados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de precisão intra e inter-ensaio para o método desenvolvido, avaliado em três níveis de concentração, utilizando mistura dos padrões de ácidos orgânicos.

Analito	Concentração (mg L^{-1})	Intra-ensaio (CV %) n=3		Inter-ensaio (CV %) n=6	
		Tempo de retenção (min)	Área do sinal	Tempo de retenção (min)	Área do sinal
Acético	1	0,31	4,83	3,11	20,38
	2	0,59	10,49	2,35	16,19
	4	0,35	17,95	1,74	18,32
Aminocapróico	1	0,74	22,16	16,86	13,58
	2	0,76	24,70	3,12	17,22
	4	0,81	17,18	2,87	23,45
Ascórbico	1	1,25	10,16	2,71	13,04
	2	1,64	12,10	2,75	11,02
	4	1,28	16,37	2,67	15,85
Aspártico	1	0,76	20,12	5,69	17,34
	2	0,79	6,68	5,08	15,95
	4	0,88	16,11	1,87	12,78
Cetoglutárico	1	0,14	11,23	3,24	12,40
	2	0,37	6,03	3,25	9,61
	4	0,37	9,69	3,18	9,49

Tabela 14. (continuação)

Analito	Concentração (mg L ⁻¹)	Intra-ensaio (CV %)		Inter-ensaio (CV %)	
		n=3		n=6	
		Tempo de retenção (min)	Área do sinal	Tempo de retenção (min)	Área do sinal
Fumárico	1	0,98	7,61	2,01	15,25
	2	3,41	10,58	0,60	14,15
	4	1,47	17,39	1,85	9,86
Glicólico	1	0,72	12,28	2,24	8,35
	2	0,75	13,23	2,38	9,59
	4	0,65	10,48	2,33	8,06
Glucônico	1	1,83	11,39	4,63	14,31
	2	2,09	17,42	3,95	17,70
	4	2,05	12,02	4,06	13,55
Glutâmico	1	0,57	7,13	2,79	12,01
	2	0,34	2,69	3,32	8,36
	4	0,37	11,69	3,26	11,93
Glutárico	1	0,92	9,99	1,69	15,22
	2	0,89	12,49	1,52	9,88
	4	0,89	17,24	1,68	11,92
Isobutírico	1	0,65	8,20	3,69	14,04
	2	0,39	10,02	1,48	8,22
	4	0,30	10,91	1,72	8,60
Lático	1	0,21	10,73	2,00	17,22
	2	0,33	17,98	1,85	7,27
	4	0,27	15,96	1,94	17,44
Levulínico	1	0,15	15,65	2,29	18,59
	2	0,15	5,30	1,61	9,97
	4	0,13	6,08	1,20	17,62
Maleico	1	0,15	3,92	2,14	7,34
	2	0,14	9,78	1,88	17,73
	4	0,13	8,68	1,75	16,47
Málico	1	1,12	8,88	2,21	17,07
	2	0,77	12,18	2,73	15,38
	4	1,08	10,92	3,06	14,01
Malônico	1	0,28	10,39	2,66	12,56
	2	0,40	12,82	2,23	15,58
	4	0,49	6,50	2,18	10,28
Pirúvico	1	0,51	15,04	3,77	14,68
	2	0,42	17,99	3,03	10,75
	4	0,32	12,01	3,10	11,48
Propiônico	1	0,18	16,79	1,98	4,67
	2	0,16	19,34	2,49	7,28
	4	0,23	17,71	2,39	19,09
Succínico	1	0,13	9,19	1,71	11,93
	2	0,09	11,24	2,48	8,97
	4	0,15	10,18	2,30	17,99

Fonte: Autora.

Os valores de CV da precisão intra-ensaio variaram de 0,09 a 3,41 % para tempo de retenção e 2,69 a 24,87 % para área do sinal. Observou-se um maior CV para precisão inter-ensaio, os valores variaram entre 0,60 a 16,86 % para tempo de retenção e 4,67 a

23,45 % para área do sinal aplicando o método desenvolvido. Os resultados obtidos para precisão intra-ensaio para tempo de retenção foram considerados adequados. De acordo com a AOAC (2016), o coeficiente de variação está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, sendo que para níveis de concentração da ordem de mg L^{-1} consideram-se adequados valores de CV de até 11%. Para a maioria dos analitos, os resultados obtidos com os testes de precisão foram adequados (menores que 11 %), no entanto foram obtidos alguns resultados de CV acima do recomendado. De forma geral, pode-se considerar o método preciso para a maioria dos ácidos orgânicos.

7 APLICAÇÃO DO MÉTODO

7.1 VINAGRE

A identidade e concentração dos ácidos orgânicos alifáticos presentes no vinagre podem fornecer informações a respeito da composição do material, crescimento microbiológico e até mesmo técnicas de processamento. Para a aplicação do método proposto, cinco amostras diferentes de vinagre foram utilizadas para determinação dos ácidos orgânicos. Duas amostras de vinagre de cana-de-açúcar, duas de vinagre de maçã e uma de vinagre de mel. Os resultados obtidos em cada uma das amostras estão apresentados nas Tabelas 15 a 20.

Tabela 15. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinagre de cana-de-açúcar 1

Analito	Média \pm SD (mg L^{-1})
Lático	0,22 \pm 0,01
Propiônico	0,52 \pm 0,09
Succínico	0,93 \pm 0,02

Fonte: Autora.

Tabela 16. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinagre de cana-de-açúcar 2.

Analito	Média \pm SD (mg L^{-1})
Aminocapróico	0,13 \pm 0,01
Lático	0,65 \pm 0,01
Propiônico	0,45 \pm 0,01
Succínico	0,87 \pm 0,02

Fonte: Autora.

Tabela 17. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de maçã 1.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Glicólico	0,16 ± 0,01
Glucônico	0,96 ± 0,01
Lático	1,25 ± 0,02
Pirúvico	0,28 ± 0,02
Propiônico	0,99 ± 0,01
Succínico	1,70 ± 0,02

Fonte: Autora.

Tabela 18. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de maçã 2.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Aminocapróico	0,31 ± 0,02
Glucônico	0,56 ± 0,01
Lático	1,31 ± 0,03
Pirúvico	0,30 ± 0,02
Propiônico	1,35 ± 0,04
Succínico	2,29 ± 0,03

Fonte: Autora.

Tabela 19. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre de mel.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Aminocapróico	0,78 ± 0,04
Glucônico	0,68 ± 0,03
Lático	0,26 ± 0,01
Propiônico	1,66 ± 0,04
Succínico	2,62 ± 0,03

Fonte: Autora.

Tabela 20. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de vinagre balsâmico.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Acético	68,91 ± 0,01
Aspártico	12,49 ± 0,01
Maleico	97,25 ± 0,01
Propiônico	1368,63 ± 0,01

Fonte: Autora.

Alguns trabalhos de determinação de ácidos orgânicos em vinagre estão presentes na literatura. Com o objetivo de comparar os ácidos encontrados nos vinagres testados neste trabalho com aqueles presentes na literatura, foram escolhidos cinco trabalhos previamente publicados.

No trabalho de (LIU et al., 2018), foram avaliados os ácidos orgânicos presentes em vinagre de arroz e foi encontrada uma grande variedade deles: oxálico, tartárico, metanoico, málico, pirúvico, lático, acético, piroglutâmico, cítrico, succínico e fumárico. Sendo que os ácidos pirúvico, lático e succínico também foram encontrados em todas as

amostras de vinagre utilizadas neste trabalho, portanto teve-se apenas as concentrações destes que foram (g L^{-1}) $1,10 \pm 0,089$; $1,130 \pm 0,059$ e $0,570 \pm 0,029$, respectivamente. As concentrações de ácido láctico foram similares com as encontradas nos dois vinagres de maçã, e o ácido succínico apresentou concentrações mais elevadas nos vinagres testados neste trabalho, enquanto para o ácido pirúvico os resultados foram inferiores.

Segundo o trabalho de (LALOU et al., 2015), foram determinados os ácidos orgânicos encontrados em vinagre balsâmico. Os ácidos cítrico, fórmico, láctico, málico e succínico foram encontrados e os ácidos em comum com este trabalho foram o láctico e o succínico. A concentração encontrada pelos autores (em g/kg) para láctico foi de 0,12 a 0,98 e para succínico foi de 0,19 a 0,43. Pode-se perceber que as concentrações encontradas neste trabalho estão próximas a estes resultados, de 0,22 a $1,34 \text{ g L}^{-1}$ para láctico e foram superiores para succínico, de 0,86 a $2,68 \text{ g L}^{-1}$.

No trabalho de SÁIZ-ABAJO, GONZÁLEZ-SÁIZ e PIZARRO (2005), foram avaliadas as quantidades de ácidos orgânicos presentes em vinagre de vinho branco, de vinho tinto, de álcool, de malte e de maçã. Os ácidos encontrados foram o tartárico, málico, láctico, acético, cítrico e succínico. As concentrações encontradas para láctico foram: de 0,16 a 1,61 para vinagre de vinho branco, 0,14 a 0,94 para vinagre de vinho tinto, 4,66 para vinagre de malte e 1,12 a 2,44 para vinagre de maçã, todas concentrações em g L^{-1} . Para ácido succínico: 0,18 a 1,62 para vinagre de vinho branco, 0,27 a 1,23 para vinagre de vinho tinto, 0,33 a 8,51 para vinagre de malte e 0,51 a 1,79 para vinagre de maçã. Com estes resultados, pode-se comparar as quantidades dos ácidos láctico e succínico nos vinagres de maçã, 1,25 e 1,31 de concentração média para ácido láctico 1,70 e 2,29 para ácido succínico.

Há também dois trabalhos de determinação de ácidos orgânicos em vinagres que foram publicados na década de 90, o trabalho de Romero e Mufioz (1993), no qual foram determinados ácidos orgânicos em vinagre por HPLC. Foram encontrados os ácidos tartárico, málico, xiquímico, láctico, acético, cítrico, succínico e fumárico. Para os ácidos láctico e succínico, as concentrações foram de 0,1 a 1,8, de 0,03 a $0,58 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. O outro trabalho de MORALES, GONZALEZ e TRONCOSO (1998), em que foram determinados ácidos orgânicos por cromatografia de exclusão iônica. Os ácidos encontrados foram: cítrico, tartárico, málico, láctico e acético. A concentração de ácido láctico encontrada foi de 0,21 a $0,65 \text{ g L}^{-1}$.

Com isso, pode-se evidenciar o potencial analítico do método proposto em relação a métodos previamente reportados na literatura. Particularmente para amostras de

vinagre, o método desenvolvido neste trabalho apresentou desempenho satisfatório para grande parte dos compostos em estudo.

7.2 VINHO

Existem dois tipos de processo de fermentação do vinho, o primário (clássico) e o secundário (fermentação malolática). A fermentação clássica é característica das regiões do sul da Europa (França, Itália, Espanha e Portugal), e o ácido tartárico é o mais comum de ser encontrado nestes vinhos. A fermentação malolática é mais comum nas regiões do norte da Europa (Áustria, Alemanha e Reino Unido), o clima é mais frio e a luz solar apresenta menor intensidade, levando a maiores níveis de ácidos carboxílicos, em especial o ácido málico. O tipo de fermentação é determinado pela composição química das uvas e com isso, as principais diferenças dos vinhos provêm das diferentes proporções entre os ácidos carboxílicos (málico, tartárico, láctico e cítrico) (MILOVANOVIC et al., 2019). Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra vinho.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Acético	362,49 ± 0,84
Fumárico	170,78 ± 0,99
Glicólico	46,00 ± 0,71
Málico	652,19 ± 1,19
Malônico	63,91 ± 0,17
Pirúvico	398,68 ± 1,27
Propiônico	281,70 ± 1,02

Fonte: Autora.

A análise de ácidos orgânicos em vinhos é necessária para o controle de qualidade, bem como para monitorar a evolução da acidez durante os diferentes estágios de vinificação, já que alterações importantes no vinho podem ser detectadas por alterações no teor de ácido (SILVA et al., 2015).

7.3 CERVEJA

Os ácidos orgânicos presentes na cerveja fornecem informações importantes sobre a qualidade e história do produto, determinando propriedades organolépticas e sendo

indicadores úteis do desempenho da fermentação (RODRIGUES et al., 2010). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de cerveja.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Acético	94,19 ± 1,26
Aspártico	92,37 ± 1,20
Cetoglutárico	106,52 ± 1,18
Lático	130,26 ± 1,20
Málico	93,11 ± 1,00
Succínico	130,37 ± 1,13

Fonte: Autora.

Um estudo sobre ácidos orgânicos na cerveja (MONTANARI et al., 1999), reporta os seguintes ácidos e suas concentrações (em mg L⁻¹) em diferentes tipos de cerveja: ácido málico (14-105), pirúvico (10-104), láctico (44-292), acético (31-171), cetoglutárico (0-20), cítrico (56-230), succínico (36-166) e citramálico (6-15). Os valores encontrados na cerveja utilizada neste trabalho foram um pouco abaixo para acético, láctico e succínico, e ficaram próximos aos valores encontrados na literatura, para os ácidos cetoglutárico e málico.

7.4 SUCO DE LARANJA

A indústria de sucos de frutas é um dos setores que mais crescem na indústria mundial de bebidas. Isso se deve pelo fato de que os sucos de frutas, que são amplamente consumidos, são uma parte importante da dieta humana, e se tornaram muito populares devido aos seus muitos benefícios para a saúde (como por exemplo, vitaminas e minerais essenciais, ajuda na prevenção de câncer, ajuda na digestão, propriedades anti-inflamatórias, aumenta a resistência óssea (JANDRIC et al., 2014).

A separação, identificação e quantificação dos principais ácidos orgânicos presentes em sucos de fruta é de considerável importância, uma vez que sua presença e relação relativa podem afetar as características químicas e organolépticas do suco (por exemplo, pH, acidez total, aceitabilidade) (CHINNICI et al., 2005) fornecendo também informações úteis não apenas sobre sua autenticidade, mas também sobre alterações microbiológicas que podem ter ocorrido anteriormente (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR et al., 2015). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de suco de laranja.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Ascórbico	460,18 ± 0,17
Aspártico	517,21 ± 0,95
Cetoglutárico	480,59 ± 0,86
Glutárico	649,99 ± 1,14
Lático	1190,69 ± 0,07
Málico	302,04 ± 0,14
Pirúvico	1870,26 ± 1,01

Fonte: Autora.

Segundo o trabalho de (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR et al., 2015), foram encontrados os ácidos isocítrico (84,94 a 197,08 µg mL⁻¹), málico (1604,98–2344,80µg mL⁻¹) e cítrico (8665,77–15864,28µg mL⁻¹). E no trabalho de (SCHERER, RYBKA, et al., 2012), foram encontrados os ácidos ascórbico (320 mgL⁻¹), cítrico (5170 mg L⁻¹), málico (290mg L⁻¹) e tartárico (152 mg L⁻¹).Embora não tenham sido achados muitos ácidos em comum (apenas os ácidos ascórbico e málico), neste trabalho foi encontrada uma gama maior de ácidos orgânicos do que nos trabalhos citados.

7.5 IOGURTE

Durante a fermentação do iogurte, as bactérias do ácido láctico hidrolisam a lactose em glicose e galactose, e produzem ácidos orgânicos. Além disso, os ácidos orgânicos no leite fermentado também são originados do metabolismo animal durante a produção de leite e hidrólise da gordura do leite durante o processamento e armazenamento. Estes compostos são indicadores importantes da atividade bacteriana no iogurte e contribuem para o desenvolvimento das características sabor e sabor desse tipo de produto. O conteúdo de carboidratos e ácidos orgânicos pode ser usado, como pH e acidez, para monitorar o processo de fermentação por culturas iniciais e bactérias probióticas (COSTA et al., 2016). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Resultados das análises dos ácidos orgânicos alifáticos na amostra de iogurte.

Analito	Média ± SD (mg L⁻¹)
Aspártico	177,18 ± 1,16
Cetoglutárico	239,09 ± 1,08
Glutárico	103,66 ± 1,19
Lático	855,54 ± 0,08
Málico	329,83 ± 1,18
Propiônico	289,71 ± 1,16

Fonte: Autora.

No trabalho de Costa et al. (2016) foram avaliados os ácidos cítrico, láctico e fórmico em iogurte, para o ácido láctico que é o único ácido em comum deste trabalho, foram encontrados valores de 7550 a 7649 mg L⁻¹. Neste trabalho foi encontrada uma concentração mais baixa, no entanto foram determinados mais ácidos orgânicos.

7.6 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DA LITERATURA

Neste trabalho foi desenvolvido um método para determinar 19 ácidos orgânicos por HPLC-MS/MS. Foi utilizado mecanismo de separação por HILIC, através da coluna SeQuant® ZIC®-HILIC e volume de injeção de 15 µL. A fase móvel foi composta de acetonitrila e solução tampão formiato de amônio (8 mmol L⁻¹, pH 3) na proporção 75:25 (v/v) e foi usado um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Tempo total de corrida de 20 minutos. Foi avaliado o desempenho analítico do método sendo determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os analitos, os quais variaram de 0,0032 – 0,6349 mg L⁻¹ e 0,0092 – 1,9048 mg L⁻¹, respectivamente. Os estudos de adição e recuperação realizados para as amostras de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte revelaram uma recuperação variando 40,69 a 159,41 %. O preparo das amostras consistiu em apenas diluição.

Com o objetivo de comparar o método desenvolvido e proposto neste trabalho, com outros métodos de determinação de ácidos orgânicos recentes, descritos na literatura, foram selecionados cinco trabalhos e suas principais características estão descritas a seguir.

No trabalho de Mortera et al. (2018), foi desenvolvido um método RP-HPLC-DAD para determinação de 11 ácidos orgânicos em iogurte, leite fermentado, queijo e vinho. Foi utilizada coluna C18 a temperatura ambiente com fase móvel de tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Com tempo de corrida de 10 minutos. Os comprimentos de onda utilizados foram de 206 a 288 nm. Foram obtidos limites de detecção de LD de 0,03 a 0,40 mmol L⁻¹ e de quantificação LQ de 0,09 a 1,21 mmol L⁻¹. O preparo das amostras consistiu em diluir as amostras, depois estas foram centrifugadas e foram filtradas com filtro 0,45 µm de PVDF.

No trabalho de Coelho et al. (2018), foi desenvolvido um método para análise de 5 ácidos orgânicos, sendo eles tartárico, málico, láctico, cítrico e acético, em amostras de vinho e suco de uva. Foi utilizado HPLC-DAD para separação, coluna de troca iônica Hi-

Plex H (300 × 7,7 mm) com partícula interna de 8,0 µm, e temperatura de 70 °C. Comprimento de onda do DAD foi mantido em 210 nm; e fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹ com tempo de corrida 20 min. Fase móvel foi de 4.0 mmol L⁻¹ H₂SO₄ em água ultrapura. Obtiveram recuperações entre 76 e 106% e foram obtidos limites de detecção de 0,003 a 0,044 g L⁻¹ e de quantificação de 0,008 a 0,199 g L⁻¹.

No trabalho de Costa et al. (2016), foi desenvolvido um método para análise dos ácidos cítrico, láctico e fórmico por HPLC-DAD em amostras de leite e iogurte de cabra. Coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm); temperatura da coluna de 60 °C. Fase móvel aquosa com 3 mmol/L de ácido sulfúrico pH 2,35; volume de injeção de 20 µL; fluxo 0,5 ml/min; comprimento de onda do DAD 210 nm. Tempo total de corrida de 30 minutos. Foram obtidos limites de detecção LD de 0,001 a 0,003 µg g⁻¹ e de quantificação LQ de 0,003 a 0,013 µg g⁻¹. Foram alcançadas recuperações de 89 a 109 %. O preparo da amostra consistiu em acidificação das amostras com ácido sulfúrico, após isso as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes foram filtrados com filtro de PVDF de 0,45 µm e por fim, foram estocados a 4 °C.

No trabalho de Aquino et al. (2015) foi desenvolvido um método para análise dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico por HPLC-DAD em amostras de águas residuais de fécula de mandioca azeda. Foi utilizada coluna C18 para a separação a um fluxo de 0,6 ml min⁻¹. Fase móvel 0,02 mol/L de KH₂PO₄ tampão pH 2,88 e 2% metanol. Comprimento de onda de 220 nm. Tempo de corrida de 20 minutos. Foram obtidos limites de detecção LD de 1 a 3,7 mg L⁻¹ e de quantificação LQ de 3,1 a 12,2 mg L⁻¹; e foram obtidas recuperações de 88 a 104 %. O preparo da amostra consistiu em diluição e acidificação das amostras.

No trabalho de Ibáñez e Bauer (2014), foi desenvolvido um método por HPLC-TOF para determinação de 24 ácidos orgânicos alifáticos e fenólicos presente em biomassa hidrolisada, pré-tratada com ácido diluído e extração com solvente. Foi utilizada coluna empacotada com resina de troca catiônica baseada em polímeros de poliestireno-divinilbenzeno, a coluna foi mantida a 55 °C. Como fase móvel utilizaram solução aquosa de ácido fórmico 0,5 % a um fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Tempo total de corrida de 12 minutos. Foram obtidos limites de quantificação LQ de 0,2 a 2,9 µg mL⁻¹ e limite de detecção LD de 0,03 a 0,7 µg mL⁻¹ e recuperações de 73,9 a 425,6%. Do total de 24 ácidos orgânicos, 13 são alifáticos e o restante são fenólicos.

Algo comum aos trabalhos de determinação de ácidos orgânicos, presentes na literatura é a utilização de colunas de troca iônica ou fase reversa e de equipamentos de

cromatografia líquida equipados com detector DAD. Além disso, a composição da fase móvel, no caso de utilização de coluna de troca iônica consiste em apenas solução aquosa ácida, sem presença de solvente orgânico. Para satisfazer a separação em colunas de troca iônica, é necessário utilizar temperaturas altas, por volta de 55 a 70 °C. Outra observação, é que na maioria destes trabalhos são quantificados poucos tipos de ácidos orgânicos (de 3 a 13), e com tempos de corrida variando de 10 a 30 minutos.

No método desenvolvido e proposto neste trabalho, é utilizada uma forma de separação inovadora (HILIC), sendo utilizada temperatura da coluna de 30 °C. Outro fator foi a utilização de solvente orgânico presente na fase móvel (ideal para detecção por MS), detecção mais sensível (HPLC-MS/MS) e com frequência analítica alta (19 ácidos orgânicos em 20 minutos de corrida). Em relação aos limites de detecção e quantificação, os trabalhos encontrados na literatura apresentam limites próximos aos obtidos neste trabalho.

8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foi desenvolvido um método analítico para a determinação simultânea de uma grande variedade de ácidos orgânicos e foi otimizado com sucesso. A otimização detalhada de alguns importantes fatores que afetam a separação e determinação dos analitos foi realizada e uma avaliação criteriosa do efeito de matriz causado pela complexidade das amostras foi conduzida.

Foi possível obter os espectros de massa de todos analitos, foi avaliada a utilização da coluna cromatográfica baseada no mecanismo HILIC, SeQuant® ZIC®-HILIC 3.5µm, 100Å 150 x 4.6 mm, a qual exibiu um satisfatório desempenho para a separação dos compostos com características polares que foram objeto deste estudo. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C. Foi otimizada a composição da fase móvel e o pH, sendo fixado em modo isocrático 75% de acetonitrila e 25% de solução tampão formiato de amônio pH 3. A influência da força iônica na fase móvel também foi estudada e a melhor concentração de sal adicionada foi de 8 mmol L⁻¹. Foi otimizado o volume de injeção, o qual foi mantido em 10 µL.

Foi avaliado também o desempenho analítico do método através da seletividade, linearidade, estudo do efeito de matriz e avaliação da precisão e exatidão. Nesta etapa do trabalho, pode-se observar as dificuldades encontradas em determinações simultâneas de

uma grande variedade de compostos, tendo em vista as características físico-químicas dos analitos, bem como as particularidades na determinação envolvendo HPLC-MS/MS.

Foi observada a necessidade de utilização de calibração por adição de padrão devido a complexidade das matrizes alimentícias. No entanto, esta necessidade não compromete a aplicabilidade e viabilidade do método proposto, uma vez que em uma curva de adição de padrão para uma amostra são obtidas informações qualitativas e quantitativas de 19 ácidos orgânicos em matriz complexa, portanto são obtidas muitas informações com este método.

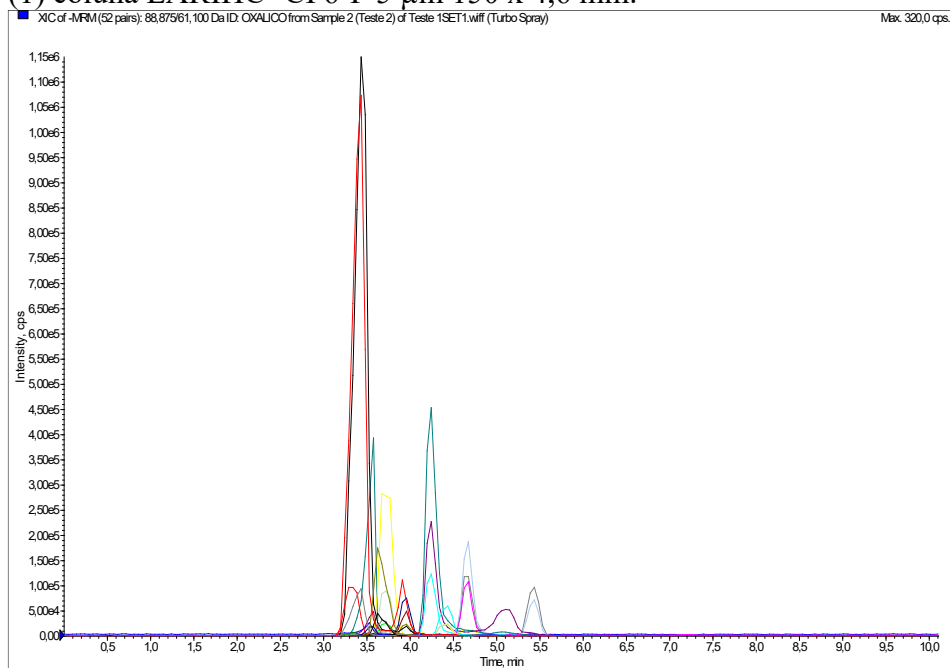
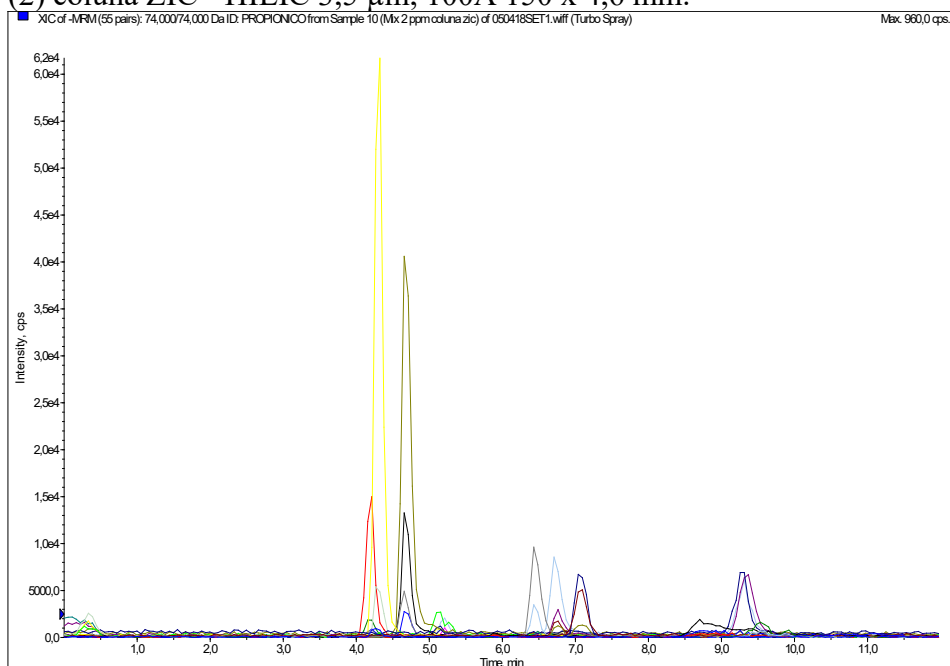
Por fim, foi realizada a aplicação do método em matrizes de vinagre, vinho, cerveja, suco de laranja e iogurte. De acordo com a maioria dos métodos analíticos para determinação de ácidos orgânicos reportados na literatura, este método possibilita determinação de uma maior gama de ácidos orgânicos de forma simultânea. Pode-se evidenciar o potencial de aplicação desta nova metodologia baseando-se nos resultados satisfatórios obtidos para a maioria dos compostos em estudo. Desta forma, a mesma pode ser expandida para outros tipos de amostra, respeitando os testes analíticos necessários para sua implementação.

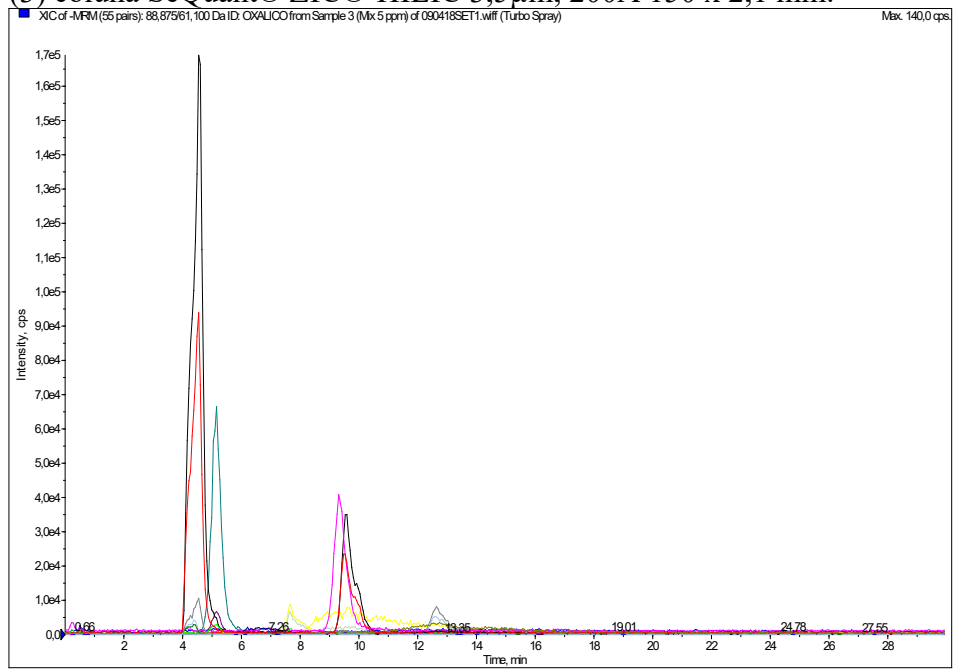
Como perspectivas, existe a possibilidade de uso de métodos de extração avançados que podem prevenir o efeito de matriz observado no método, e isto traz a possibilidade de calibração interna para quantificação dos analitos nas diversas matrizes utilizando apenas uma curva de calibração externa com padrão interno.

APÊNDICE A

Teste com três colunas HILIC, todos os cromatogramas foram obtidos com uma mistura dos ácidos orgânicos em concentração de 2 a 5 mg L⁻¹, como a composição da fase móvel utilizou-se (60:40 v/v) de acetonitrila e água ultrapura, fluxo de 500 µL min⁻¹, temperatura das colunas a 30 °C e volume de injeção de 10 µL.

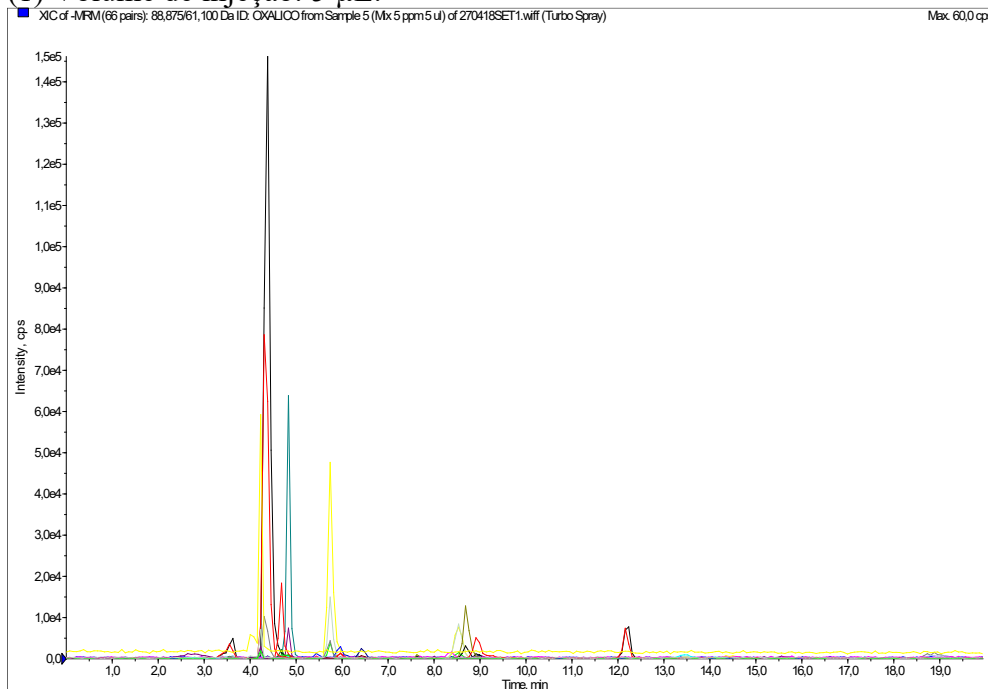
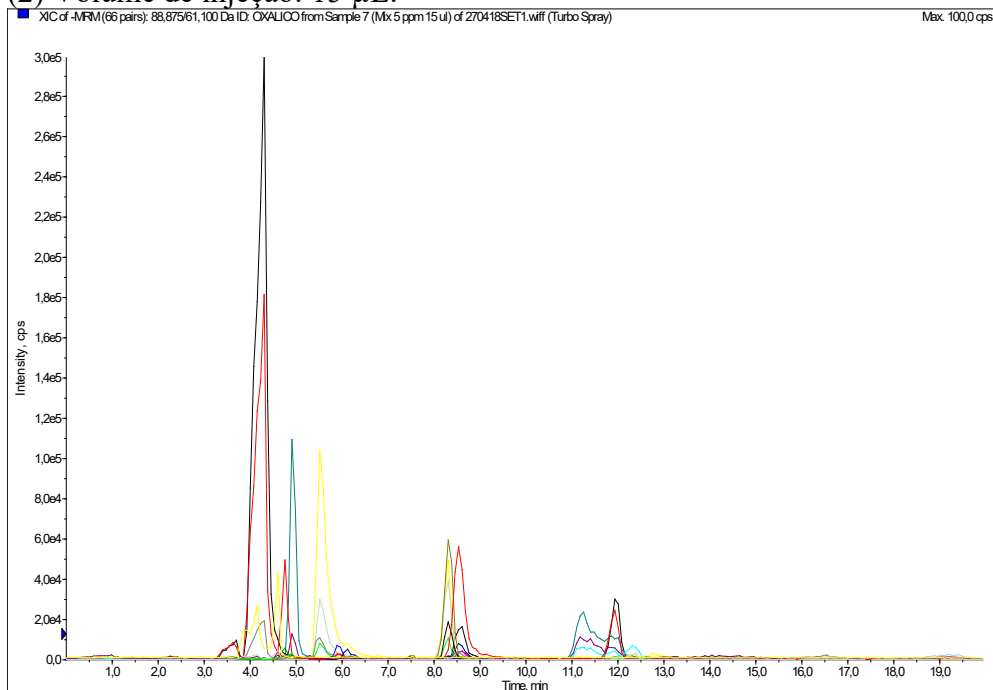
(1) coluna LARIHC- CF6-P 5 µm 150 x 4,6 mm.

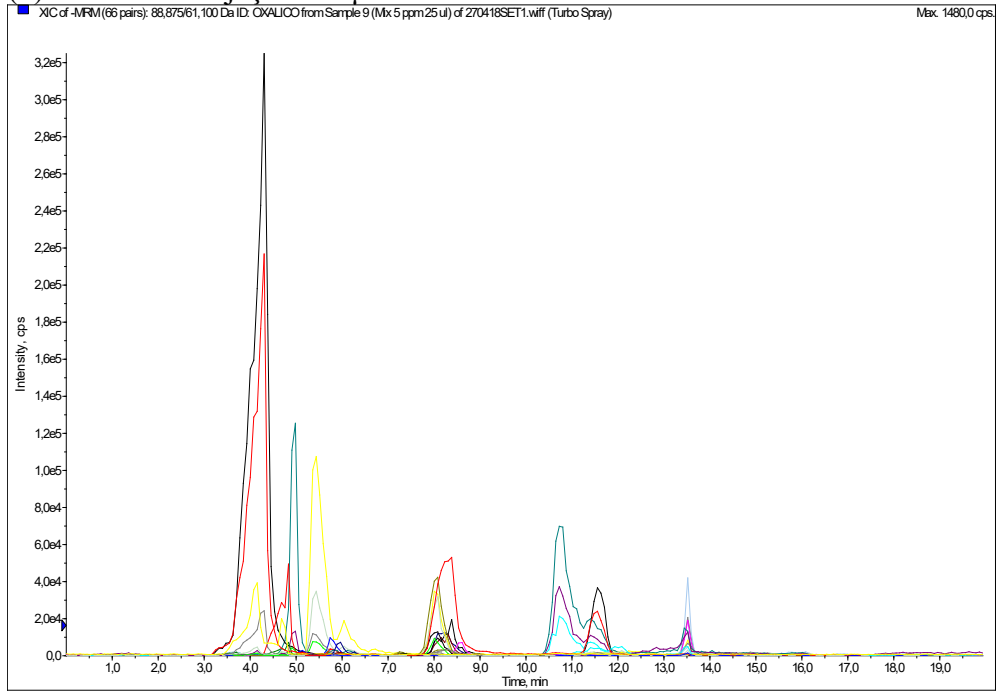
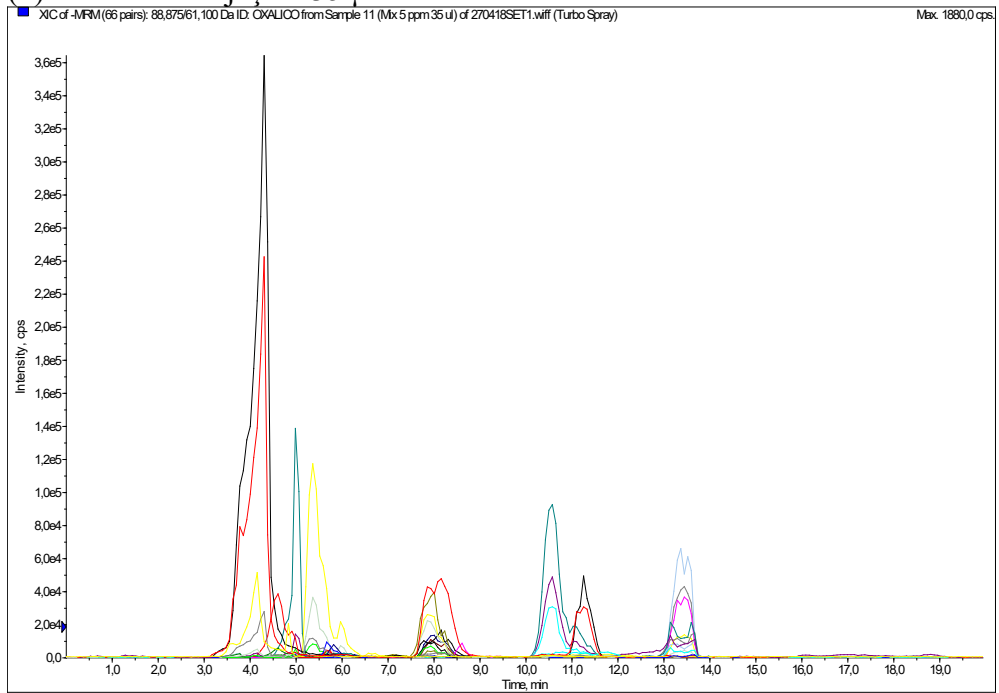
(2) coluna ZIC[®]-HILIC 3,5 µm, 100Å 150 x 4,6 mm.

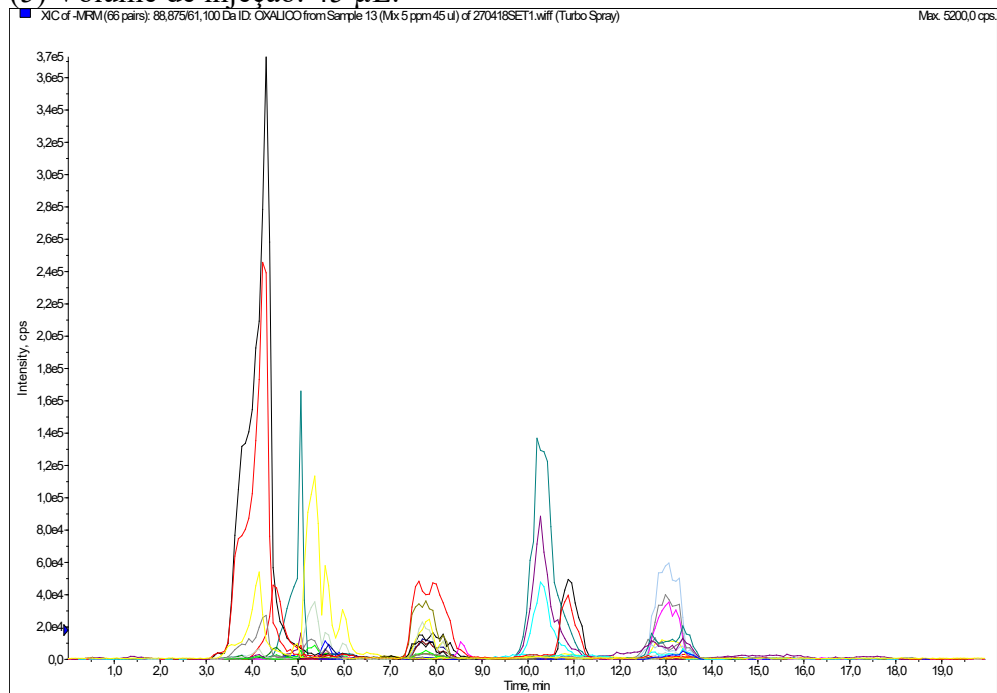
(3) coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3,5µm, 200Å 150 x 2,1 mm.

APÊNDICE B

Teste com diferentes volumes de injeção, todos os cromatogramas foram obtidos com a coluna SeQuant® ZIC®-HILIC 3,5 μ m, 200Å 150 x 2,1 mm. Mistura dos ácidos orgânicos em concentração 5 mg L⁻¹, com a composição da fase móvel (75:25 v/v) acetonitrila e tampão formiato de amônio pH 3, fluxo de 500 μ L min⁻¹, temperatura da colunas 30 °C e volume de injeção variado.

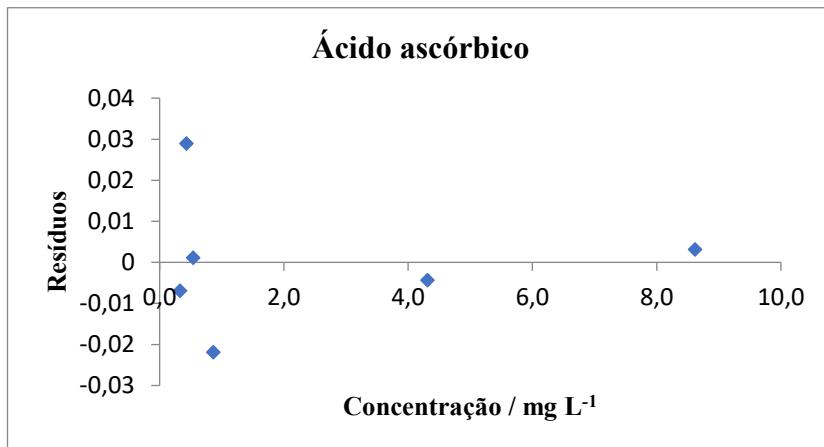
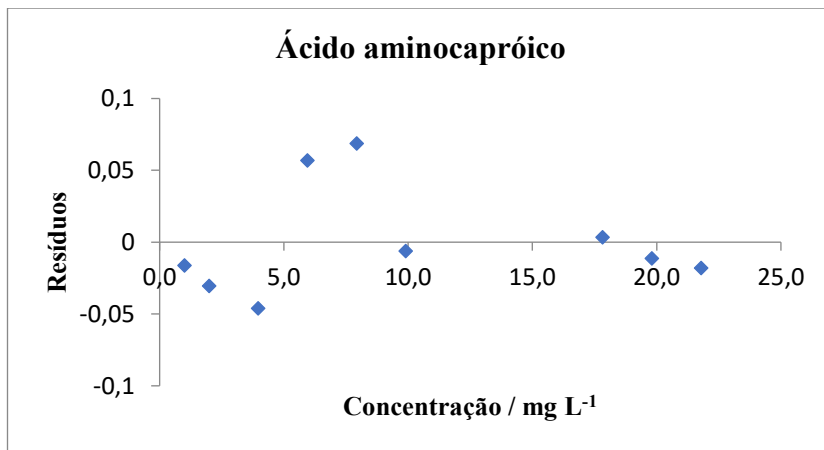
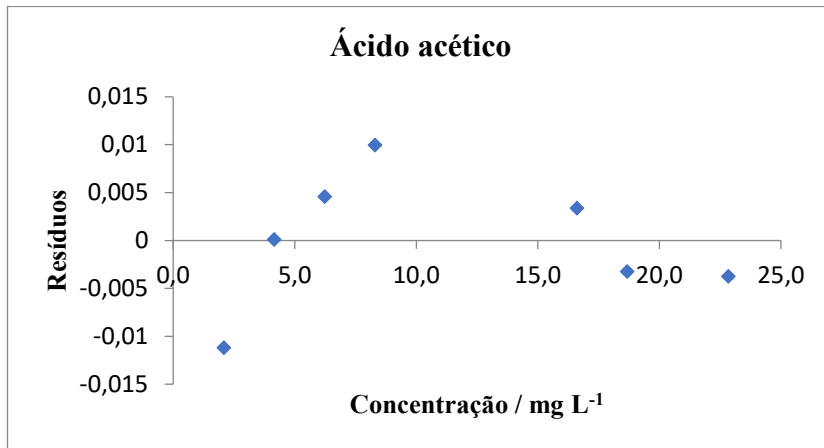
(1) Volume de injeção: 5 μ L.(2) Volume de injeção: 15 μ L.

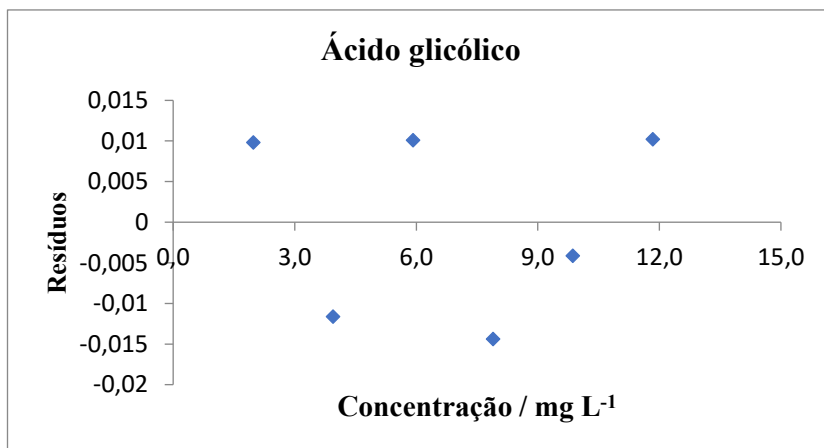
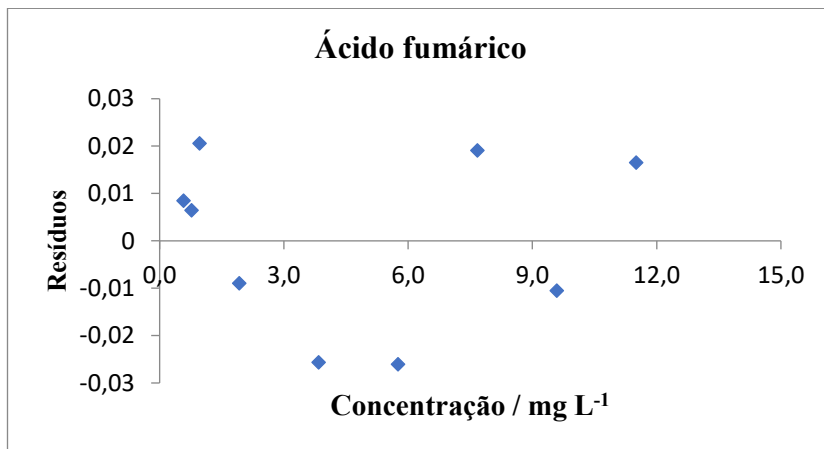
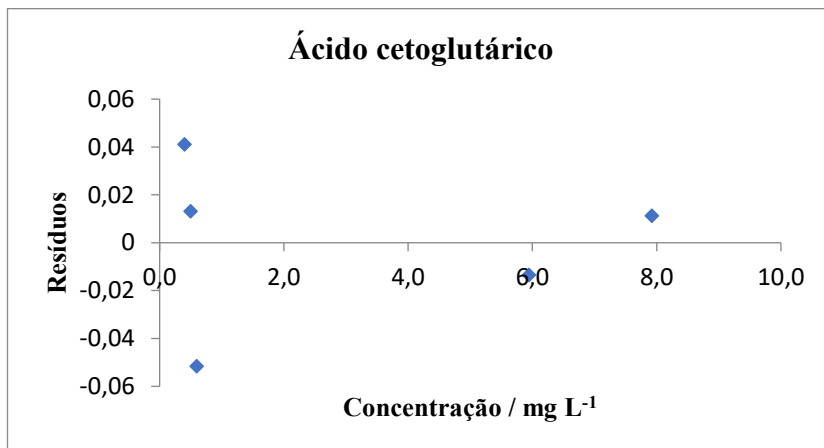
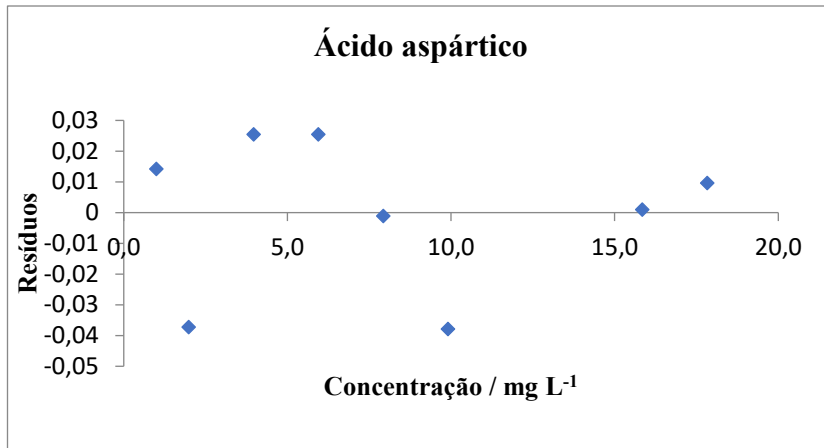
(3) Volume de injeção: 25 μ L.**(4) Volume de injeção: 35 μ L.**

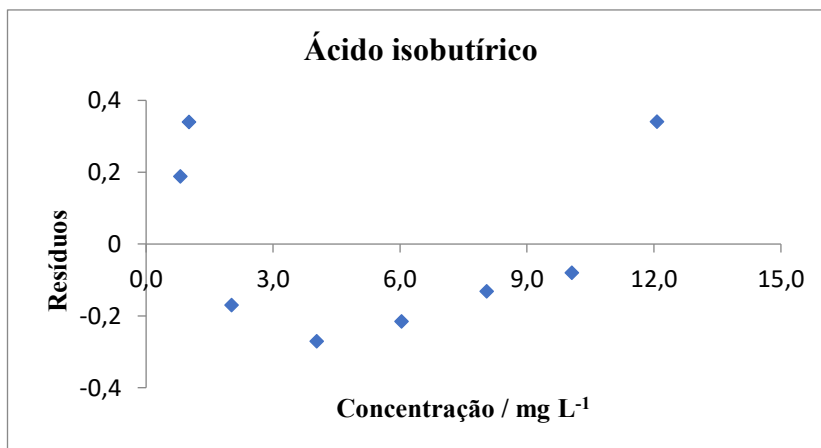
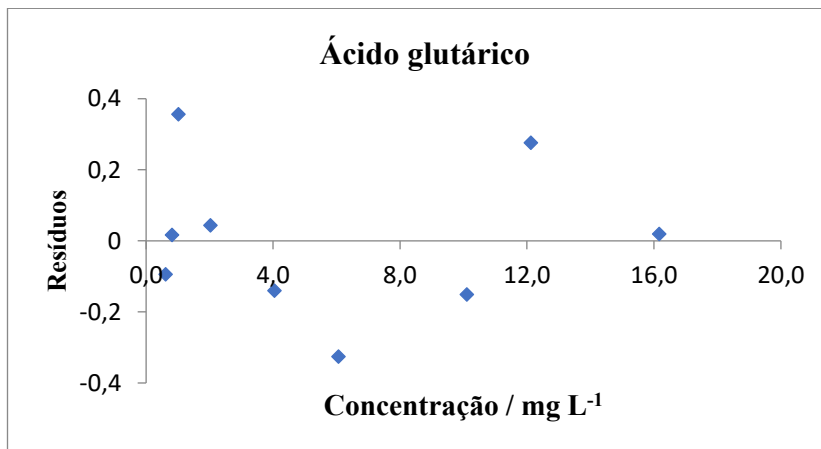
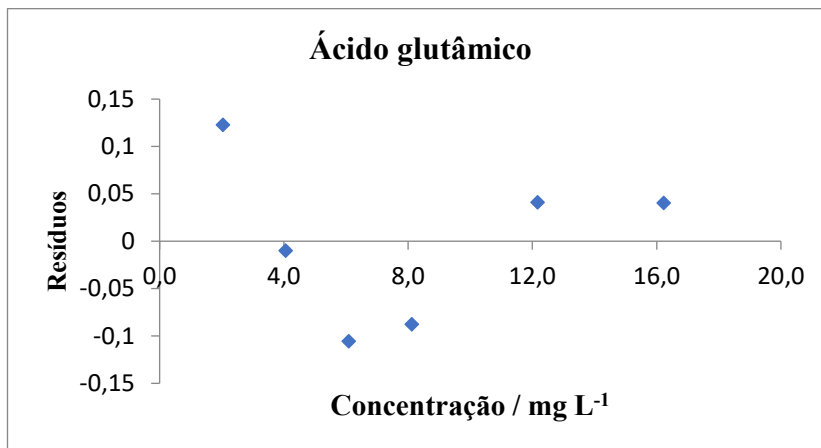
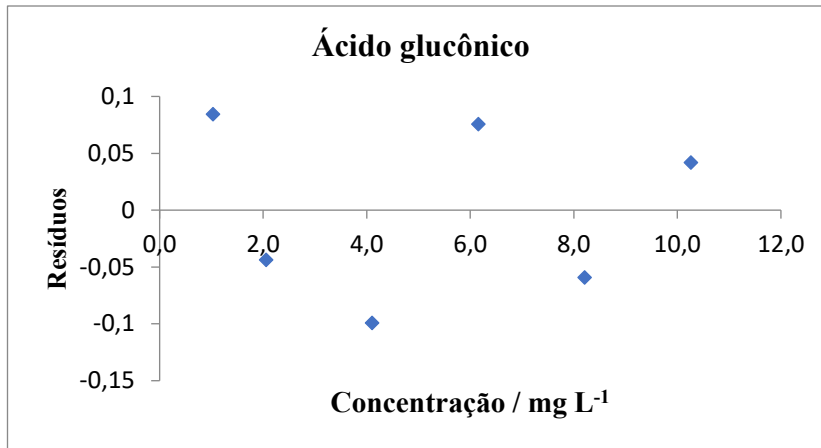
(5) Volume de injeção: 45 μ L.

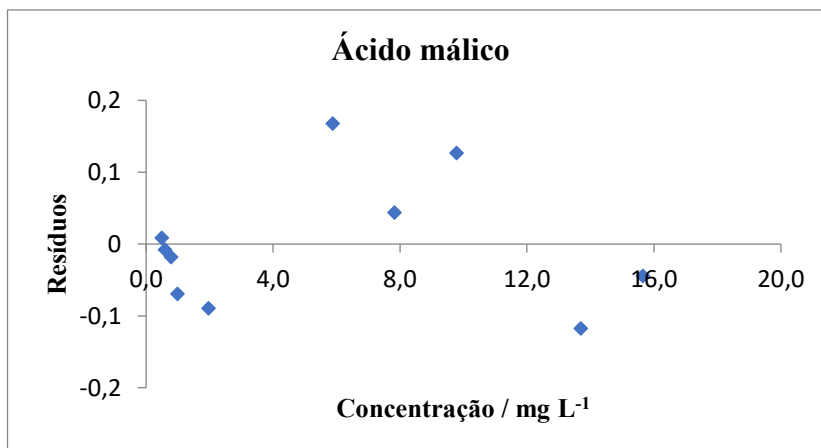
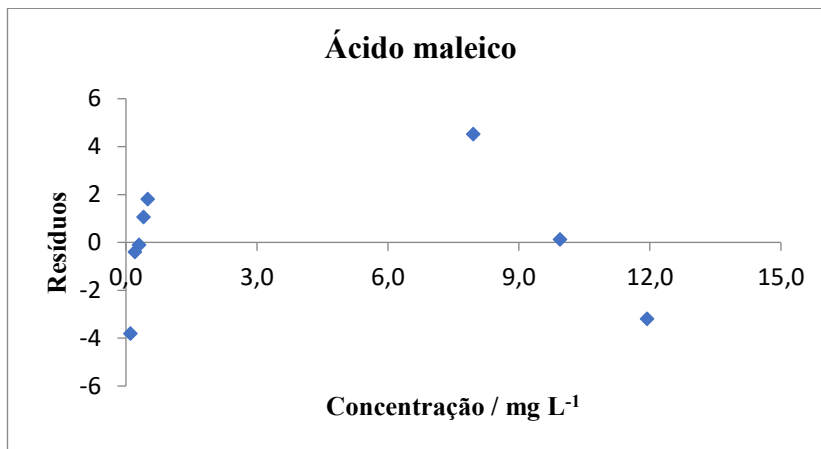
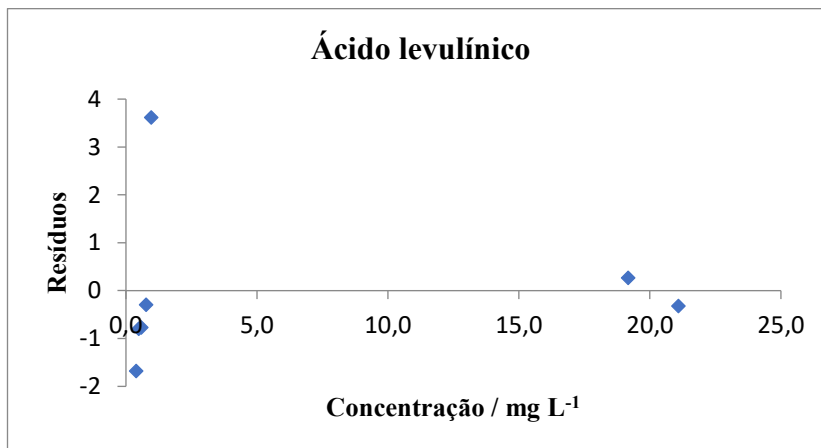
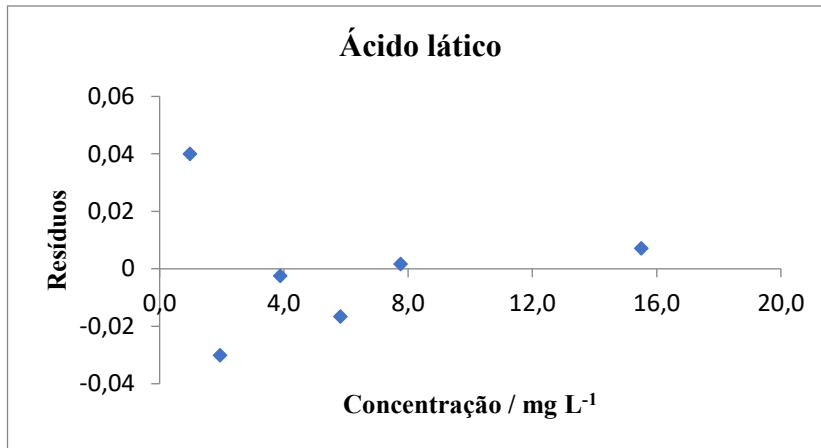
APÊNDICE C

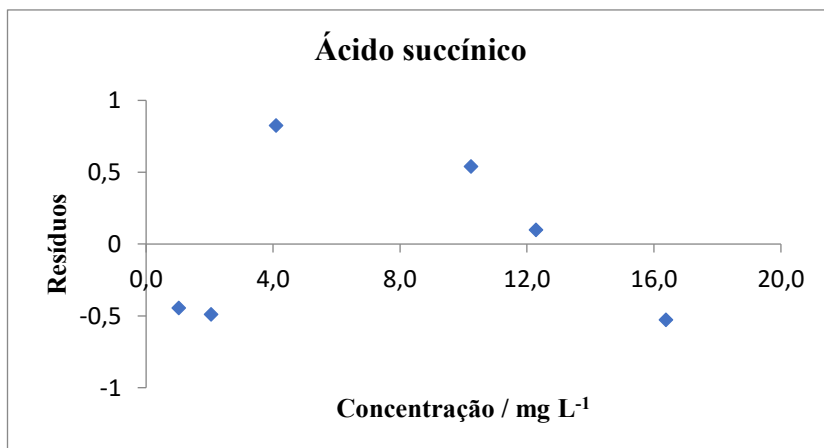
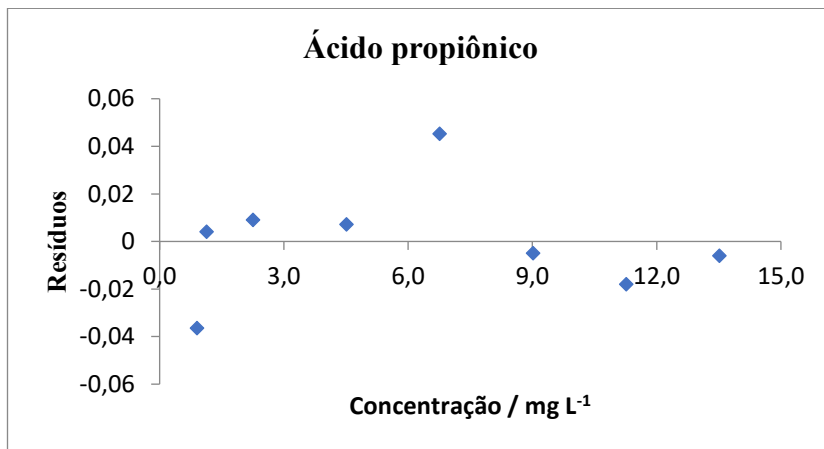
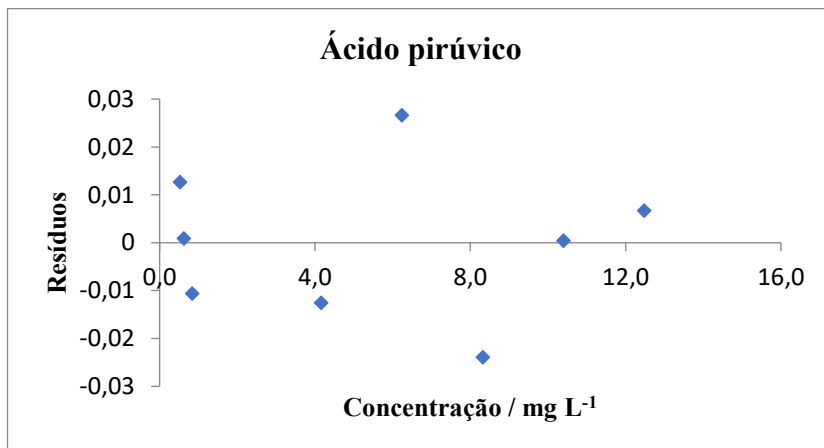
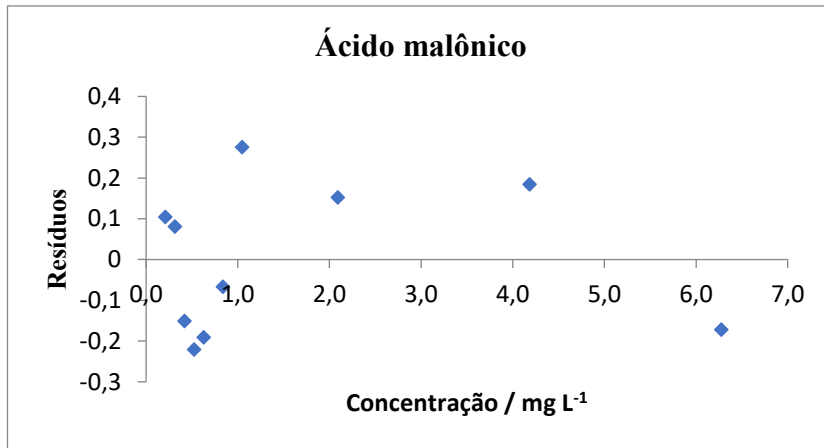
Gráficos de distribuição de resíduos obtidos para os ácidos orgânicos











9 REFERÊNCIAS

ALPERT, Andrew J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal Of Chromatography A**, v. 499, p.177-196, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)96972-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)96972-3).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 166**: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília, 2017. 22 p. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2019.

ANYASI, Tonna A.; JIDEANI, Afam I.o.; MCHAU, Godwin R.a.. Effect of organic acid pretreatment on some physical, functional and antioxidant properties of flour obtained from three unripe banana cultivars. **Food Chemistry**, v. 172, p.515-522, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.120>.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **APPENDIX F**: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Washington, 2016. 18 p. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: 01 set. 2019.

APPELBLAD, Patrik et al. **A practical guide to HILIC: including ZIC®-HILIC applications**. Umea: Merck SeQuant AB, 2008. 30 p.

AQUINO, Ana Carolina Moura de Sena et al. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, v. 172, p. 725-730, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.142>.

AVDEEF, A. **Log P values measured by pION Inc**. Seminar on Ionization and Lipophilicity. Brookline, MA: 1997.

BARROS, Lillian; PEREIRA, Carla; FERREIRA, Isabel C. F. R.. Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p.309-316, 25 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>.

BRITO, Natilene Mesquita et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p.129-146, 31 dez. 2003. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>.

BUSZEWSKI, Bogusław et al. Evaluation of HPLC columns: A study on surface homogeneity of chemically bonded stationary phases. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 3-4, p.313-321, 1 mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200390037>.

BUSZEWSKI, Bogusław; NOGA, Sylwia. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p.231-247, 31 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.

CARROLL, Felix A. **Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry**. 2. ed. New Jersey: Wiley, 2014. 972 p.

CASTIÑEIRA, A. et al. Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.319-331, jun. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jfca.2002.1056>.

CHINNICI, Fabio et al. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p.121-130, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.01.005>.

CHIRITA, Raluca-ioana et al. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 35, p.5939-5963, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.002>.

CHMELÍK, Josef et al. Characterization of the hydrophobic properties of amino acids on the basis of their partition and distribution coefficients in the 1-octanol-water system. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 56, n. 10, p.2030-2041, 1991. Institute of Organic Chemistry & Biochemistry. <http://dx.doi.org/10.1135/cccc19912030>.

COELHO, Emanuela Monteiro et al. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 66, p.160-167, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

COSTA, Marion Pereira da et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. **Talanta**, v. 152, p.162-170, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.061>.

CUBBON, Simon et al. Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 23, p.8911-8918, dez. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac071008v>.

DAWIDOWICZ, Andrzej L.; FIJALKOWSKA, Anna Determination of Propofol in Blood by HPLC. Comparison of the Extraction and Precipitation Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 33, n. 7, p.377-382, 1 jul. 1995. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/33.7.377>.

DELL'AVERSANO, Carmela; HESS, Philipp; QUILLIAM, Michael A.. Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p.190-201, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056>.

DILL, Ken A. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 7, p.1980-1988, mar. 1987. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/j100291a060>.

FIORUCCI, Antônio Rogério; SOARES, Márlon Herbert F. B.; CAVALHEIRO, Éder Tadeu G. Ácidos Orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. **Química nova na escola**, n. 15, p. 6-10, maio 2002.

FLORES, Pilar; HELLÍN, Pilar; FENOLL, José. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p.1049-1054, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.064>.

FOURDINIER, Marion et al. Interest of a chemometric approach in understanding the retention behaviour of three columns in hydrophilic interaction liquid chromatography: Application to the separation of glycerol carbonate, glycerol and urea. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p.1281-1287, 15 jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.021>.

FU, Qing et al. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p.2690-2697, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.09.033>.

GRECO, G.; LETZEL, T. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 7, p.684-693, 13 mar. 2013. Oxford University Press. <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>.

GARBIS, Spiros D. et al. Determination of Foliates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p.5358-5364, nov. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac010741y>.

GIUMANINI, Angelo G. et al. Improved Method for the Analysis of Organic Acids and New Derivatization of Alcohols in Complex Natural Aqueous Matrixes: Application to Wine and Apple Vinegar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p.2875-2882, jun. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0103368>.

GUIMARÃES, Rafaela et al. Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p.947-954, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.007>.

GUO, Yong; GAIKI, Sheetal. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1-2, p.71-80, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>.

HÄGGLUND, Per et al. A New Strategy for Identification of N-Glycosylated Proteins and Unambiguous Assignment of Their Glycosylation Sites Using HILIC Enrichment and Partial Deglycosylation. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p.556-566, jun. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/pr034112b>.

HANSCH, Corwin; LEO, Albert; HOEKMAN, David. **Exploring QSAR: Vol. 2: Hydrophobic, electronic, and steric constants**. Washington: American Chemical Society, 1995. 348 p. (ACS professional reference book).

HARRIS, Daniel C.. **Análise Química Quantitativa**. 9. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2017. 966 p.

HAYNES, William M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 91. ed. Boca Raton: Crc Press, 2010-2011. 2610 p.

HEMSTRÖM, Petrus; IRGUM, Knut. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p.1784-1821, ago. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600199>.

HO, Chin Wai et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. **Food Chemistry**, v. 221, p.1621-1630, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.128>.

HORIE, Kanta et al. Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1-2, p.198-205, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.012>.

HUANG, Yin et al. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p.37-42, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.038>.

IBÁÑEZ, Ana B; BAUER, Stefan. Analytical method for the determination of organic acids in dilute acid pretreated biomass hydrolysate by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Biotechnology For Biofuels**, v. 7, n. 1, p.2-9, 8 out. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-014-0145-3>.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: 1 ed. Brasília, 2003. 36 p.

Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_01.pdf>. Acesso em: 02 set. 2019.

IWASAKI, Yusuke et al. Analysis of glutathione and glutathione disulfide in human saliva using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 839, n. 1-2, p.74-79, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.033>.

JANDRIĆ, Z. et al. Assessment of fruit juice authenticity using UPLC–QToF MS: A metabolomics approach. **Food Chemistry**, v. 148, p.7-17, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.014>.

JHAM, Gulab N. et al. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p.99-104, 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.629>.

KADER, Adel A. Flavor quality of fruits and vegetables. **Journal of The Science Of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p.1863-1868, 30 ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3293>.

KARLSSON, Göran; WINGE, Stefan; SANDBERG, Helena. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 2, p.246-249, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.025>.

KNOX, John H.; PRYDE, Andrew. Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, v. 112, p.171-188, jan. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)99951-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)99951-5).

KOTANI, Akira et al. Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p.1440-1444, mar. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0306486>.

LALOU, Sofia et al. Beyond traditional balsamic vinegar: Compositional and sensorial characteristics of industrial balsamic vinegars and regulatory requirements. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 43, p.175-184, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.07.001>.

LANÇAS, Fernando M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.

LEROY, Frédéric; VUYST, Luc de. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p.67-78, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

LI, Ruiping; HUANG, Junxiong. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n. 1-2, p.163-169, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.033>.

LINDEN, James C.; LAWHEAD, Charles L. Liquid chromatography of saccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 105, n. 1, p.125-133, fev. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)81096-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(01)81096-7).

LIU, Lu et al. Fermenting liquid vinegar with higher taste, flavor and healthy value by using discarded *Cordyceps militaris* solid culture medium. **Lwt**, [s.l.], v. 98, p.654-660, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.064>.

MILLIPORE, Merck. **Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography**. 2019. Clicar em HILIC Mechanism. Disponível em: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt/analytcs-and-sample-preparation/sequant/what-is-hilic/lh2b.qB.xfgAAAFFw6IcWdZp,nav>>. Acesso em: 09 jun. 2019.

MILOVANOVIC, Miodrag et al. A novel method for classification of wine based on organic acids. **Food Chemistry**, v. 284, p.296-302, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.113>.

MONTANARI, Luigi et al. Organic and Phenolic Acids in Beer. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 32, n. 8, p.535-539, dez. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1999.0593>.

MORALES, M. Lourdes; GONZALEZ, A. Gustavo; TRONCOSO, Ana M.. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. **Journal Of Chromatography A**, v. 822, n. 1, p.45-51, set. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00572-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00572-x).

MORTERA, Pablo et al. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. **Talanta**, v. 178, p.15-23, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.005>.

NAIDONG, Weng. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. **Journal of Chromatography B**, v. 796, n. 2, p.209-224, nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.08.026>.

NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, María et al. Quality control of fruit juices by using organic acids determined by capillary zone electrophoresis with poly(vinyl alcohol)-coated bubble cell capillaries. **Food Chemistry**, v. 188, p.596-603, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.057>.

NÚÑEZ, Oscar; NAKANISHI, Kazuki; TANAKA, Nobuo. Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromato**

graphy A, v. 1191, n. 1-2, p.231-252, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.029>.

OERTEL, R.; NEUMEISTER, V.; KIRCH, W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1058, n. 1-2, p.197-201, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.158>.

OHIRA, Shin-ichi et al. On-line electro-dialytic matrix isolation for chromatographic determination of organic acids in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p.18-24, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.077>.

OLSEN, Bernard A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1-2, p.113-122, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)01063-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)01063-3).

OYLER, Alan R. et al. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 724, n. 1-2, p.378-383, fev. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00987-6](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(95)00987-6).

PALMA, Serena di et al. Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 9, p.3440-3447, maio 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac103312e>.

PÉREZ-RUIZ, Tomás et al. High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1-2, p.57-64, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.130>.

REGNIER, F. E.; NOEL, R.. Glycerolpropylsilane Bonded Phases in the Steric Exclusion Chromatography of Biological Macromolecules. **Journal Of Chromatographic Science**, v. 14, n. 7, p.316-320, 1 jul. 1976. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/14.7.316>.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.164-171, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000100029>.

RISLEY, Donald S.; STREGE, Mark A. Chiral Separations of Polar Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 8, p.1736-1739, abr. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac9911490>.

RODRIGUES, Carla Isabel et al. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 20, n. 5, p.440-448, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.005>.

RODRIGUES, J. E. A. et al. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p.166-175, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.029>.

ROMERO, E. García et al. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, v. 655, n. 1, p.111-117, nov. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)87018-h](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(93)87018-h).

RONG, L.; LIM, L. W.; TAKEUCHI, T. Determination of Iodide and Thiocyanate in Seawater by Liquid Chromatography with Poly(ethylene glycol) Stationary Phase. **Chromatographia**, 61, 2005. 371-374.

RONG, Li; TAKEUCHI, Toyohide. Determination of iodide in seawater and edible salt by microcolumn liquid chromatography with poly(ethylene glycol) stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, n. 1-2, p.131-135, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.032>.

RUBINSTEIN, Menachem. Preparative high-performance liquid partition chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.1-7, set. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90697-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90697-3).

SÁIZ-ABAJO, M. J.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; PIZARRO, Consuelo. Multi-objective optimisation strategy based on desirability functions used for chromatographic separation and quantification of l-proline and organic acids in vinegar. **Analytica Chimica Acta**, v.528, n. 1, p.63-76, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.027>.

SANDÍN-ESPAÑA, Pilar et al. Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC-ESI-MS. **Food Chemistry**, v. 192, p.268-273, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.012>.

SANGSTER, James. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 18, n. 3, p.1111-1229, jul. 1989. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.555833>.

SCARLATA, Christopher J.; HYMAN, Deborah A. Development and validation of a fast high pressure liquid chromatography method for the analysis of lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 14, p.2082-2087, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.061>.

SCIENTIFIC, Thermo. **Thermo Scientific: HILIC Separations Technical Guide**. Waltham: Thermo Scientific, 2014. 44 p. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf>>. Acesso em: 02 set. 19.

SCHERER, Rodrigo et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p.150-154, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p.591-611, dez. 1965. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2333709>.

SHREVE, R. Norris; BRINK JR., Joseph A. **A indústria de processos químicos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. 718 p.

SILVA, Flamys Lena do Nascimento et al. Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p.53-62, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4ay00114a>.

SNEDECOR, George W.; COCHRAN, William G. **Statistical Methods**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989. 503 p.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; GLAJCH, Joseph L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOYER, Y.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n. 5, p.629-636, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0889-1575\(03\)00065-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0889-1575(03)00065-6).

STREGE, Mark A. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, p.2439-2445, jul. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac9802271>.

STREGE, Mark A.; STEVENSON, Stephanie; LAWRENCE, Steve M. Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 19, p.4629-4633, out. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac000338b>.

SUN, Ping et al. Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p.10215-10226, 15 dez. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac902257a>.

TANAKA, Hiroyuki; ZHOU, Xiaojing; MASAYOSHI, Ohira. Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p.119-125, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01949-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01949-0).

TARAJI, Maryam et al. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1000, p.20-40, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.041>.

WANG, H. L.; DUDA, J. L.; RADKE, C. J. Solution adsorption from liquid chromatography. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 66, n. 1, p.153-165, ago. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9797\(78\)90196-0](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9797(78)90196-0).

WANG, Xiande; LI, Weiyong; RASMUSSEN, Henrik T. Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, n. 1-2, p.58-62, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.082>.

GUO, Yong; GAIKI, Sheetal. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1-2, p.71-80, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>.

YING, Peter T.; DORSEY, John G.; DILL, Ken A. Retention mechanisms of reversed-phase liquid chromatography: determination of solute-solvent interaction free energies. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 22, p.2540-2546, 15 nov. 1989. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac00197a017>.

YOSHIDA, Tatsunari. Prediction of peptide retention time in normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 811, n. 1-2, p.61-67, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00216-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00216-7).

YOSHIDA, Tatsunari; OKADA, Tadashi. Peptide separation in normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 840, n. 1, p.1-9, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00223-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00223-x).

ZERAVIK, Jiri et al. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. **Food Chemistry**, v. 194, p.432-440, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.013>.

ZHANG, A. et al. Analysis of low molecular weight organic acids in several complex liquid biological systems via HPLC with switching detection wavelength. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p.449-455, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.09.017>.