



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LabEC – LABORATÓRIO DE ELETROFORESE CAPILAR

**Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações em
amostras de uísques**

Melina Heller
Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR
Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

FLORIANÓPOLIS
FEVEREIRO DE 2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

H477e Heller, Melina

Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações em amostras de uísques [dissertação] / Melina Heller ; orientador, Gustavo Amadeu Micke. - Florianópolis, SC, 2010.

93 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Uísque. 3. Aldeídos. 4. Açúcares. 5. Ácidos alifáticos. 6. Eletroforese de zona. 7. Stacking. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

MELINA HELLER

**Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações de
amostras em uísques**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisi-
tos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química –
Área: Química Analítica.

FLORIANÓPOLIS
01 DE FEVEREIRO DE 2010.

SUMÁRIO

I.	Agradecimentos	
III.	Resumo	
V.	Abstract	
VII.	Lista de abreviações	
IX.	Lista de equações	
X.	Lista de figuras	
XIII.	Lista de tabelas	
Capítulo 1 – Introdução e Objetivos		01
1.1	Introdução	03
1.1.1	O úísque e seu processo de fabricação	03
1.1.2	A problemática das falsificações	05
1.1.3	Eletroforese capilar	07
1.1.3.1	Instrumentação	08
1.1.3.2	Fundamentação teórica	10
1.1.3.3	Técnicas de pré-concentração	14
1.1.4	Referências bibliográficas	15
1.2	Objetivos	21
1.2.1	Objetivo geral	21
1.2.2	Objetivos específicos	21
Capítulo 2 – Análise de aldeídos fenólicos em amostras de uísque mediante uso de “stacking”		22
2.1	Introdução	24
2.2	Procedimento experimental	25
2.2.1	Instrumentação	25
2.2.2	Reagentes e soluções	26
2.2.3	Amostras	26
2.2.3.1	Procedência das amostras	26
2.2.3.2	Preparação das amostras	26
2.3	Resultados e discussão	26
2.3.1	Otimização do eletrólito de corrida	26
2.3.2	Estratégias de pré-concentração “on-line”	31
2.3.2.1	“Normal stacking mode”	31
2.3.2.2	“Stacking with matrix removal”	32
2.3.3	Figuras de mérito	37
2.3.4	Análise das amostras	38
2.4	Conclusão	41
2.5	Referências bibliográficas	41

Capítulo 3 – Análise de frutose, glicose e sacarose em amostras de uísque utilizando eletroforese capilar

	43
3.1 Introdução	45
3.2 Procedimento Experimental	46
3.2.1 Instrumentação	46
3.2.2 Reagentes e soluções	47
3.2.3 Amostras	47
3.2.3.1 Aquisição das amostras	47
3.2.3.2 Preparo das amostras	47
3.3 Resultados e discussão	47
3.3.1 Composição do eletrólito de corrida	47
3.3.2 Parâmetros instrumentais	49
3.3.3 Condições analíticas do método	50
3.3.4 Análise das amostras	51
3.4 Conclusão	54
3.5 Referências bibliográficas	54

Capítulo 4 – Verificação da autenticidade de amostras de uísque através da determinação dos ácidos acético, fórmico, láctico e glicólico utilizando eletroforese capilar

	58
4.1 Introdução	60
4.2 Procedimento Experimental	61
4.2.1 Instrumentação	61
4.2.2 Reagentes e soluções	62
4.2.3 Amostras	62
4.3 Resultados e discussão	62
4.3.1 Identificação dos analitos	62
4.3.2 Desenvolvimento do eletrólito de corrida	64
4.3.3 Características analíticas do método	67
4.3.4 Análise das amostras	67
4.3.5 Análise por componentes principais	69
4.4 Conclusão	71
4.5 Referências bibliográficas	72

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter me dado forças para continuar em momentos difíceis pelos quais passei nestes dois anos de mestrado.
- Aos meus pais, Helio e Vali, e ao meu irmão, Leonardo, por me amarem tanto e me apoiarem sempre.
- Ao meu orientador, Professor Gustavo Micke, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.
- Aos colegas “labequianos” Ana, Mika, Marcel, Rafael, Daniel, Luciano, Tiele, Andressa, Thiago, pela ajuda, amizade e pelo excelente ambiente de trabalho.
- A todos os amigos conquistados nestes anos de Academia, que não vou citar por medo de esquecer alguém, pelo afeto, carinho e companheirismo.
- À Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo pela gentileza de ceder as amostras, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.
- Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro recebido.

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidas três metodologias analíticas utilizando eletroforese capilar com a finalidade de diferenciar uísques autênticos de amostras apreendidas por suspeita de falsificação, cedidas pela Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo. O primeiro capítulo trata da determinação simultânea dos aldeídos fenólicos: vanilina, seringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído. Estratégias de pré-concentração “on-line” (“stacking”) foram desenvolvidas para melhorar a detectabilidade do método para determinação destes compostos. Os valores de R^2 foram maiores que 0,99 para os métodos sem e com pré-concentração (respectivamente denominados, NSM e SWMR42). A razão sinal/ruído (S/N) de 3 e 10 foram consideradas para estimar o LD e o LQ. Estes valores foram $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $330 \mu\text{g L}^{-1}$; $22 \mu\text{g L}^{-1}$ e $73 \mu\text{g L}^{-1}$ para NSM e SWMR42, respectivamente. Das 30 amostras analisadas, 14 apresentaram os aldeídos fenólicos estudados abaixo do limite de detecção. O segundo capítulo se refere ao desenvolvimento de um método para determinação dos açúcares frutose, glicose e sacarose e, neste estudo, foi utilizado um planejamento fatorial de 2 níveis e 3 variáveis para otimizar os parâmetros instrumentais de temperatura do cartucho, tempo de injeção e voltagem. As curvas de calibração indicaram boa linearidade na faixa de aplicação utilizada (50 a 500 mg L^{-1}), assim como, boa correlação entre a área dos picos e a concentração dos açúcares e os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 para os três analitos. Quanto aos parâmetros de LD e LQ, estes foram de 68,42 e $228,06 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O terceiro capítulo se destina à determinação dos ácidos alifáticos: acético, fórmico, láctico e glicólico. Nesta etapa, foram utilizados *softwares* de simulação para otimizar a composição do eletrólito de corrida. As curvas de calibração para os quatro ácidos apresentaram coeficientes de determinação maiores que 0,99. Os parâmetros de LD e LQ foram melhores que 12,50 e $41,70 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A análise por componentes principais possibilitou a distinção entre os uísques autênticos envelhecidos 8 e 12 anos, assim como, a diferenciação entre as amostras autênticas e suspeitas, com base na concentração encontrada para os analitos. Os resultados obtidos nas três análises demonstraram a aplicabilidade da eletroforese capilar na identificação de amostras falsificadas de uísque.

Palavras – chave: uísque, aldeídos fenólicos, ácidos alifáticos, açúcares, eletroforese capilar de zona, “stacking”.

ABSTRACT

This work reports the development of three analytical methodologies using capillary electrophoresis in order to differentiate authentic whiskeys from samples seized under suspicion of forgery provided by the Technical-Scientific Police of São Paulo. The first chapter describes the simultaneous determination of phenolic aldehydes: vanilline, syringaldehyde, coniferaldehyde and sinapaldehyde. On-line pre-concentration techniques (stacking) were developed so as to improve the sensitivity of the method for determining these compounds. Values of R^2 were higher than 0,99 for the methods with and without pre-concentration (named SWMR42 and NSM, respectively). The signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10 were considered to estimate the LD and LQ. These values were better than 100 mg L^{-1} and 330 mg L^{-1} , 22 mg L^{-1} and 73 mg L^{-1} for NSM and SWMR42, respectively. Out of the 30 samples analyzed, 14 showed the phenolic aldehydes studied below the detection limit. The second chapter refers to the development of a method to determine the sugars fructose, glucose and sucrose, where we employed a factorial planning with 2 levels and 3 variables to optimize the instrumental parameters of the cartridge temperature, injection time and voltage. The calibration curves indicated good linearity in the range of application (50 to 500 mg L^{-1}), as well as good correlation between the peak area and the concentration of sugars. The determination coefficients were above 0,9910 for the three analytes. The LD and LQ parameters were better than $68,42$ and $228,06 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. The third chapter determines the aliphatic acids: acetic, formic, lactic and glycolic. Here we used simulation software to optimize the running electrolyte composition. The calibration curves for the four acids presented correlation coefficients greater than 0,9900. The LD and LQ parameters were better than $12,50$ and $41,70 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. The principal component analysis enabled not only the distinction between authentic whiskeys aged 8 and 12 years, but also the differentiation between the authentic samples from the suspect ones based on the concentration found for the analytes. The results obtained in the three tests showed the applicability of capillary electrophoresis to identify samples of counterfeit whiskey.

Keywords: whiskey, phenolic aldehydes, sugars, aliphatic acids, capillary electrophoresis, stacking.

LISTA DE ABREVIACÕES

- EC** - Eletroforese Capilar
CGE - Eletroforese Capilar em Gel (do inglês “capillary gel electrophoresis”)
CIEF - Focalização Isoelétrica Capilar (do inglês “capillary isoelectric focusing”)
CITP - Isotacoforese Capilar (do inglês “capillary isotachopheresis”)
MEKC - Cromatografia Eletrocinética Micelar (do inglês “micellar electrokinetic chromatography”)
CZE - Eletroforese Capilar de Zona (do inglês “capillary zone electrophoresis”)
FSCE - Eletroforese Capilar em Solução Livre (do inglês “free solution capillary electrophoresis”)
UV - VIS - Ultravioleta – Visível
NIR – Infravermelho Próximo (do inglês “near infra-red”)
FIA – Sistema de Injeção em Fluxo (do inglês flow injection analysis)
FEO - Fluxo Eletrosmótico
 μ_e - Mobilidade Eletroforética
 v_e - Velocidade Eletroforética
 v_{osm} - Velocidade do FEO
 μ_{FEO} - Mobilidade do Fluxoeletrosmótico
 μ_{ef} - Mobilidade Efetiva
 r – Raio hidratado
 ϵ_0 - Permissividade do Vácuo
 ϵ - Constante Dielétrica
 ζ - Potencial Zeta
 η - Viscosidade
E - Campo Elétrico
 α – Função de Distribuição das Espécies
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
NSM – Modo Normal de Empilhamento (do inglês “normal stacking mode”)
SWMR – Empilhamento Com Remoção de Matriz (do inglês “stacking with matrix removal”)
 t_m – Tempo de Migração
 L_{det} – Distância do ponto de injeção até o ponto de detecção
N – Número de Pratos
w – Largura da banda
TBS – Tetraborato de Sódio

MeOH – Metanol

EtOH – Etanol

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DNB – Ácido 3,5-dinitrobenzóico

mAU – miliunidades de Absorbância

LISTA DE EQUAÇÕES

Capítulo I – Introdução e Objetivos

Equação 1.1: mobilidade eletroforética	11
Equação 1.2: velocidade eletroforética	11
Equação 1.3: mobilidade efetiva	11
Equação 1.4: velocidade do fluxo eletrosmótico	12
Equação 1.5: mobilidade do fluxo eletrosmótico	12

Capítulo III - Análise de frutose, glicose e sacarose em amostras de uísque utilizando eletroforese capilar

Equação 3.1: fator de resposta	49
Equação 3.2: número de pratos	49

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Introdução e Objetivos

- Figura 1.1: Diagrama esquemático de um equipamento de EC **09**
- Figura 1.2: Representação do fluxo eletrosmótico **12**
- Figura 1.3: Perfil de fluxo gerado por pressão (A) e o fluxo eletrosmótico (B) **13**

Capítulo II - Análise de aldeídos fenólicos em amostras de uísque mediante uso de “stacking”

- Figura 2.1: Estruturas dos aldeídos fenólicos estudados **24**
- Figura 2.2: Otimização da composição do eletrólito de corrida **28**
- Figura 2.3: Eletroferogramas de uma amostra suspeita (A) e de um uísque autêntico (B), em 360 nm **29**
- Figura 2.4: Eletroferogramas de uma amostra suspeita (A) e de um uísque autêntico (B), em 410 nm **29**
- Figura 2.5: Variação no tempo de injeção de uma solução padrão dos aldeídos fenólicos 1 mg L^{-1} , em 360 nm. A: 3 s. B: 6 s. C: 9 s **30**
- Figura 2.6: Eletroferograma de uma solução padrão (2 mg L^{-1}) de sinapaldeído (1), coniferaldeído (2), seringaldeído (3) e vanilina (4). A: $\lambda = 360 \text{ nm}$. B: $\lambda = 410 \text{ nm}$ **31**
- Figura 2.7: Eletroferogramas de um uísque autêntico (A e C) e de uma amostra suspeita (B e D), nos comprimentos de onda dos compostos analisados **32**
- Figura 2.8: Ilustração do fenômeno de “stacking” em um tipo de pré-concentração “on-line” denominada “stacking with matrix removal” **33**
- Figura 2.9: Variação do tempo de injeção hidrodinâmica. A – Perfil da corrente elétrica durante o procedimento de SWMR. (a = 30; b = 42; c =

60; d = 90; e = 120; f = 180 segundos). B – Altura do pico *versus* tempo de injeção usando “stacking with matrix removal” (SWMR) **34**

Figura 2.10: Eletroferogramas. (A) Amostra suspeita sem adição de padrão. (B) Amostra suspeita com adição de padrão (200 $\mu\text{g L}^{-1}$). (C) Amostra simulada com EtOH:H₂O 40:60 (v/v) e adição de padrão (200 $\mu\text{g L}^{-1}$) **35**

Figura 2.11: Eletroferogramas de uma amostra de uísque autêntico analisado nas três metodologias desenvolvidas: (A) NSM, (B) SWMR42, (C) SWMR120, nos comprimentos de onda dos compostos estudados **37**

Capítulo III - Análise de frutose, glicose e sacarose em amostras de uísque utilizando eletroforese capilar

Figura 3.1: Eletroferograma de uma mistura padrão consistindo de frutose (1), glicose (2) e sacarose (3) **50**

Figura 3.2: Eletroferogramas da análise de açúcares em amostras de uísque 12 anos. A: uísque apreendido por suspeita de falsificação. B: uísque autêntico **51**

Figura 3.3: Gráfico da concentração de frutose e glicose *versus* amostras de uísque 8 anos autênticas e suspeitas **53**

Figura 3.4: Gráfico da concentração de açúcar total (frutose + glicose) *versus* amostras de uísque 12 anos autênticas e suspeitas **53**

Capítulo IV - Verificação da autenticidade de amostras de uísque através da determinação dos ácidos acético, fórmico, láctico e glicólico utilizando eletroforese capilar

Figura 4.1: Curvas de mobilidade *versus* pH **64**

Figura 4.2: Eletroferograma simulado dos ácidos alifáticos identificados em bebidas alcoólicas, nas condições otimizadas **66**

Figura 4.3: Eletroferograma experimental de uma amostra de uísque 12 anos autêntico **66**

Figura 4.4: Comparação entre o eletroferograma do ponto da curva de calibração (A) e os de amostras de uísque doze anos, da mesma marca, porém (B) apreendido por suspeita de falsificação e (C) autêntico **68**

Figura 4.5: Comparação entre o eletroferograma do ponto da curva de calibração (A) e os de amostras de uísque oito anos, da mesma marca, porém (B) apreendido por suspeita de falsificação e (C) autêntico **68**

Figura 4.6: Gráfico de escores da primeira (ác. acético) e segunda (ác. fórmico) componentes principais **71**

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Introdução e Objetivos

Tabela 1.1 Detectores para Eletroforese Capilar [36]. 10

Capítulo II - Análise de aldeídos fenólicos em amostras de uísque mediante uso de “stacking”

Tabela 2.1. Algumas figuras de mérito de duas metodologias desenvolvidas (NSM e SWMR42). 38

Tabela 2.2. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos aldeídos fenólicos nas amostras de uísque obtidas pelos métodos desenvolvidos por eletroforese capilar. 40

Capítulo III - Análise de frutose, glicose e sacarose em amostras de uísque utilizando eletroforese capilar

Tabela 3.1. Variáveis analisadas no planejamento dos experimentos. 49

Tabela 3.2. Resultados de N para os ensaios realizados e o respectivo fator de resposta para cada analito. 49

Tabela 3.3. Características analíticas do método de determinação de açúcares. 50

Tabela 3.4. Faixa de concentração (mg L^{-1}) de sacarose, obtida pelo método proposto por eletroforese capilar. 52

Capítulo IV - Verificação da autenticidade de amostras de uísque através da determinação dos ácidos acético, fórmico, láctico e glicólico utilizando eletroforese capilar

Tabela 4.1. Determinação de ácidos alifáticos em bebidas por diversas técnicas analíticas. 63

Tabela 4.2. Figuras de mérito das curvas de calibração dos ácidos. 67

Tabela 4.3. Faixa de concentração (mg L^{-1}) dos ácidos orgânicos, obtidas pelo método proposto por eletroforese capilar. 69

Tabela 4.4. Concentrações dos analitos usadas na análise por componentes principais. 69

Capítulo I

Introdução e objetivos

1.1 Introdução

1.1.1 O uísque e seu processo de fabricação

O uísque é um tipo de bebida alcoólica produzida a partir de vários tipos de grãos, entre os quais está o milho, o centeio e, principalmente, a cevada. Este último cereal é o mais tradicional na fabricação deste destilado por ter sido o primeiro a ser utilizado em sua terra de origem, a Escócia. Do seu malte (grãos de cevada germinados) são obtidos os uísques mais valorizados do mundo, sendo que, o primeiro registro de uma transação comercial de uísque escocês data de 1494 entre um mosteiro Beneditino da cidade de Fife e a corte do rei James IV em Edinburgo, ambas na Escócia [1].

Um fator importante na classificação dos uísques é o chamado coeficiente de congêneres ou coeficiente de componentes secundários. Esta medida está relacionada à porcentagem de substâncias voláteis diferentes de álcool presentes na bebida [2]. Estas substâncias são expressas da seguinte forma:

- soma de acidez volátil, expressa em ácido acético;
- ésteres, expresso em acetato de etila;
- aldeídos, expresso em acetaldeído;
- álcoois superiores, expresso pelo somatório dos mesmos;
- furfural.

Todos estes valores devem ser expressos em mg/100 mL de álcool anidro [2].

De acordo com o tipo de cereal utilizado como matéria-prima, o uísque pode ser classificado em:

I. uísque puro de malte: uísque feito, exclusivamente, com destilado de malte com coeficiente de congêneres não inferior a 350 mg/100 mL de álcool anidro;

II. *blended whisky*: é a bebida resultante da mistura de 30% de destilado de malte com destilados alcoólicos de outros cereais (*grain whisky*), envelhecido ou não, com coeficiente de congêneres não inferior a 100 mg/100 mL em álcool anidro;

III. *grain whisky*: é a produção mais barata e resulta da destilação de álcool de trigo, milho e centeio, sacarificados, total ou parcialmente, por diastases (enzimas que atuam sobre o amido) da cevada maltada, adicionada ou não de outras enzimas naturais e destilada em alambique ou coluna, envelhecido por um período mínimo de dois anos, com coeficiente de congêneres não inferior a 100 mg/100 mL em álcool anidro;

IV. *bourbon whisky*: quando a bebida for elaborada com no mínimo 50% de destilado alcoólico simples de milho, sacarificado com cevada maltada, envelhecido por um período mínimo de dois anos, adicionado ou não de álcool etílico potável de origem agrícola, podendo ser envelhecido ou não, com o coeficiente de congêneres não inferior a 150 mg/100 mL em álcool anidro [2].

O processo de fabricação do uísque envolve as etapas de: maltagem, moagem, maceração, destilação, fermentação e envelhecimento, sendo que, os quatro últimos estágios são os mais interessantes do ponto de vista químico, pois na maceração ocorre a conversão do amido do cereal em açúcar, que é transformado em álcool pela fermentação [3-5]. O álcool, que então é chamado de “mosto fermentado de cereais”, passa por uma, duas ou até três destilações simples sucessivas até originar um líquido transparente [1].

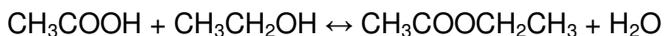
A destilação do mosto produz um tipo de destilado alcoólico de cereais (maltado, se o cereal for a cevada) que é encaminhado para o envelhecimento em barris de carvalho, etapa final da produção [3-5]. Durante a maturação ocorre uma série de reações químicas com a bebida, sendo estas as responsáveis pela cor, aroma e sabor característicos do uísque [6].

O tempo de envelhecimento varia de país para país. No Brasil, por exemplo, um destilado é considerado envelhecido se permanecer por um ano, no mínimo, em um barril de carvalho [2]. Porém, na Escócia, a bebida deve ficar por pelo menos três anos [7]. O fato é que quanto mais envelhecido for o uísque mais apreciado e valorizado ele é.

Durante o processo de envelhecimento, a concentração de aldeídos voláteis e ésteres aumenta gradativamente por todo o tempo de maturação, enquanto a acidez total aumenta somente nos primeiros anos [5].

O aldeído mais abundante, encontrado em bebidas destiladas, é o acetaldeído, formado principalmente durante a fermentação. Entre os ácidos carboxílicos o que se apresenta em maior quantidade é o ácido acético devido à oxidação do acetaldeído [8]. As oxidações dos aldeídos a ácidos são favorecidas pela presença de íons metálicos que se originam do aparelho de destilação ou da água utilizada para a correção do teor alcoólico das bebidas, pois estes íons, por exemplo, cobre, ferro, manganês atuam como catalisadores [8-10].

O componente representativo da classe dos ésteres é o acetato de etila, este se encontra em maior quantidade por causa do aumento da concentração de ácido acético, o que desloca o equilíbrio, mostrado abaixo [6]:



O carvalho é a principal madeira utilizada para o envelhecimento de destilados devido a sua durabilidade, resistência, flexibilidade para confecção dos tonéis, imunidade a pragas, entre outras qualidades [11].

O carvalho utilizado para a confecção dos tonéis na Europa são quase que exclusivamente, das espécies *Quercus robur* e *Quercus petraea*. Enquanto que na América do Norte a espécie predominantemente utilizada é a *Quercus alba*. No entanto, no Brasil o uísque é envelhecido em tonéis reutilizados, provenientes da Europa e da América do Norte [12].

Uma classe de substâncias de suma importância na modificação das propriedades organolépticas dos uísques durante a maturação são os compostos fenólicos; e a qualidade e a quantidade destes dependem do poder de extração do destilado, do tipo de madeira que é feito o barril, do tratamento térmico que é aplicado a ele e do tempo em que a bebida fica em contato com o tonel [13,14,15].

Atualmente, a importância do estudo dos polifenóis e fenóis em alimentos e bebidas alcoólicas (não destiladas e destiladas envelhecidas) se deve ao fato destes compostos diminuírem o risco de doenças cardíacas [16,17].

Enfim, de uma forma geral, o uísque que se encontra à venda nos supermercados e outros estabelecimentos comerciais é uma mistura de destilado alcoólico de cereais – que obteve a graduação alcoólica final entre 38 e 54% – acrescido de água (para redução do teor alcoólico, se necessário) e caramelo, para correção da cor [2].

1.1.2 A problemática das falsificações

Anualmente, o Governo Federal brasileiro perde milhares de reais em arrecadação de impostos com a venda de bebidas falsificadas e/ou adulteradas [18]. No entanto, não são somente danos econômicos que a adulteração de bebidas provoca, a ingestão de bebidas alcoólicas adulteradas prejudica a saúde dos consumidores devido à má qualidade das matérias-primas e das instalações utilizadas na fabricação destes produtos [19].

Em diversos artigos de jornais verificou-se que, nas apreensões realizadas pelos órgãos fiscalizadores (por exemplo, Polícia Civil de Santo André (SP) e Vigilância Sanitária), em fábricas clandestinas, em

diversas partes do Brasil, foram encontradas garrafas e vasilhames recolhidos do lixo por catadores, caixas de água servindo de barris e também determinados “ingredientes” como perfumes e corantes [20,21].

O principal risco à saúde oferecido por estas falsificações é a presença de metanol. Este álcool é um composto de estrutura química simples que é produzido naturalmente durante o processo de fermentação. Sendo assim, ele é um dos componentes secundários das bebidas alcoólicas e o limite aceitável de sua concentração é de 0,25 mL/100 mL de álcool anidro para aguardentes e outras bebidas destiladas e 0,35 g/L para vinhos [2,22]. Porém, alguns destilados obtidos pela fermentação de frutas (licores) constituem uma exceção e podem conter até 1g/100 mL (de álcool anidro) de metanol devido à presença de pectinas metoxiladas e enzimas que podem favorecer a formação desse álcool [23,24].

O álcool metílico é facilmente absorvido pelo aparelho digestivo porque é bastante solúvel em água e tem grande afinidade por lipídeos [22]. As reações metabólicas do metanol são catalisadas pela enzima álcool desidrogenase hepática e, durante o seu processo metabólico este álcool se transforma em aldeído fórmico e ácido fórmico, o que torna a sua ingestão muito perigosa pela toxicidade destes compostos [23]. Um antídoto contra os malefícios deste tipo de intoxicação é o álcool etílico, que se ingerido ao mesmo tempo inibe a oxidação metabólica do metanol [25].

Os sintomas da intoxicação por álcool metílico estão associados à quantidade ingerida e vão desde dor de cabeça, náuseas e vômitos, cegueira (se consumido em torno de 20 mL deste álcool) até a morte (em torno de 60 mL) [23,25].

Geralmente, a falsificação é realizada através da mistura de álcool (de cereais ou não-potável), água, aroma e corante caramelo a bebidas de menor valor comercial ou por diluição de bebidas autênticas com álcool e água [26].

Estudos da composição e análises espectroscópicas podem ser utilizadas para verificar a autenticidade de amostras de uísque. Pontes *et al.* usaram a espectrometria de infravermelho próximo (NIR) e métodos quimiométricos para determinar a adulteração de 69 amostras de bebidas alcoólicas [27]. A estratégia proposta se mostrou uma ferramenta atrativa e poderosa na classificação e verificação da adulteração de uísque, brandy, rum e vodka. Costa *et al.* desenvolveram uma nova metodologia para avaliar a adulteração de bebidas alcoólicas através de medidas do efeito Schlieren usando um sistema de injeção em fluxo (FIA, do inglês flow injection analysis) com detecção fotométrica [19]. A verificação da autenticidade apresentou resultados satisfatórios, identificando 100%

das amostras de bebidas adulteradas no laboratório e 93% das bebidas alcoólicas adulteradas reais com limite de confiança de 95%. González-Arjona *et al.* determinaram quatro álcoois superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol), selecionados como descritores químicos, utilizando cromatografia a gás (CG) com a técnica de injeção por “headspace”, para caracterizar e diferenciar uísques irlandeses de escoceses e *bourbons* [28].

No Brasil, os órgãos fiscalizadores empregam a cromatografia a gás para verificar a autenticidade de bebidas alcoólicas [2]. Neste contexto, a eletroforese capilar surge como uma técnica analítica atrativa, pois engloba baixo custo por análise, rapidez na aquisição e tratamento dos dados sem a necessidade de pré-tratamento das amostras com baixa geração de resíduos [29].

1.1.3 Eletroforese capilar

O fenômeno da eletroforese consiste no deslocamento de compostos iônicos ou que podem ser ionizados, quando um campo elétrico é aplicado. Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas no soro sanguíneo, e por este trabalho ganhou o prêmio Nobel em 1948 [30].

A eletroforese no formato capilar (EC) é uma técnica que foi introduzida em 1981, por Jorgenson e Lukacs e, é considerada pela comunidade científica uma poderosa ferramenta analítica [31]. A EC tem se mostrado muito eficiente na separação de íons pequenos, tanto orgânicos como inorgânicos, bebidas, alimentos, fármacos, explosivos, corantes, polímeros, proteínas e peptídeos, DNA e RNA, entre outros [32].

Atualmente, o termo eletroforese tem sido utilizado genericamente para designar todos os tipos de técnicas de separação, que englobem o estabelecimento de um campo elétrico ao longo de um capilar [33]. No entanto, cada modo de separação eletroforético possui suas próprias características. Alguns destes modos são:

- Eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”).
- Eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês “capillary gel electrophoresis”).
- Focalização isoeletrica capilar (CIEF, do inglês “capillary isoelectric focusing”).
- Isotacoforese capilar (CITP, do inglês “capillary isotachopheresis”).

- Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês “micellar electrokinetic chromatography”).
- Cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC, do inglês “microemulsion electrokinetic chromatography”).
- Eletroforese capilar em meio não-aquoso (NACE, do inglês “non-aqueous capillary electrophoresis”).

O presente trabalho baseou-se no modo CZE da CE também conhecida com eletroforese em solução livre (FSCE, do inglês “free solution capillary electrophoresis”), que consiste em introduzir a amostra num tubo capilar na presença de uma solução tampão, ao qual é aplicado uma diferença de potencial. Após a geração de um campo elétrico ao longo do tubo capilar, os componentes da amostra migram com velocidade constante, independentemente uns dos outros, como consequência de suas mobilidades [29,33].

Entre as características favoráveis inerentes à técnica estão a rapidez, e, a capacidade de se aplicar vários métodos de análise à mesma amostra utilizando o mesmo tubo capilar [34]. Além da quantidade reduzida de amostra (injeção na ordem de nanolitros), outras vantagens relacionadas a eletroforese capilar são, o baixo custo por análise, alto poder de separação, baixo consumo de reagentes e solventes e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo [34]. Outro benefício é o fato de ser compatível com diversos tipos de detectores, entre eles os de absorção no UV-VIS e de espectrometria de massas [30].

Entre todos os modos eletroforéticos, a CZE se destaca por permitir através da utilização de capilares, a dissipação do calor gerado pelo efeito Joule no seu interior com maior eficiência, devido à aplicação de campos elétricos altos. Este melhor desempenho está relacionado à geometria do capilar, cuja área superficial externa é bem maior em relação ao volume interno [35].

1.1.3.1 Instrumentação

O instrumento é composto de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida com diâmetro interno de 15 a 100 μm e comprimento entre 30 e 150 cm), eletrodos (os de platina são os mais utilizados) e um detector (Figura 1.1) [35]. A fonte de alta tensão estabelece um campo elétrico ao longo do capilar podendo operar com tensão constante (-30 a 30 kV) e/ou corrente constante (-200 a 200 μA) [35].

Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um dispositivo, denominado cartucho, que facilita a introdução do capilar no aparelho além de facilitar a dissipação do calor. O controle de temperatura do capilar é muito importante para assegurar a repetitividade das separações. O controle é realizado geralmente por ar ou líquido refrigerante, confinado no interior do cartucho onde se encontra o capilar [34,35].

O tubo capilar é, então, preenchido com um eletrólito de corrida que pode ser uma solução tampão e suas extremidades são mergulhadas em recipientes (contendo a mesma solução), onde é aplicada uma diferença de potencial, que gera uma corrente elétrica no interior do capilar. Os eletrodos também são mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar possui uma “janela de detecção”, a qual é convenientemente posicionada em um sistema de detecção, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis [30].

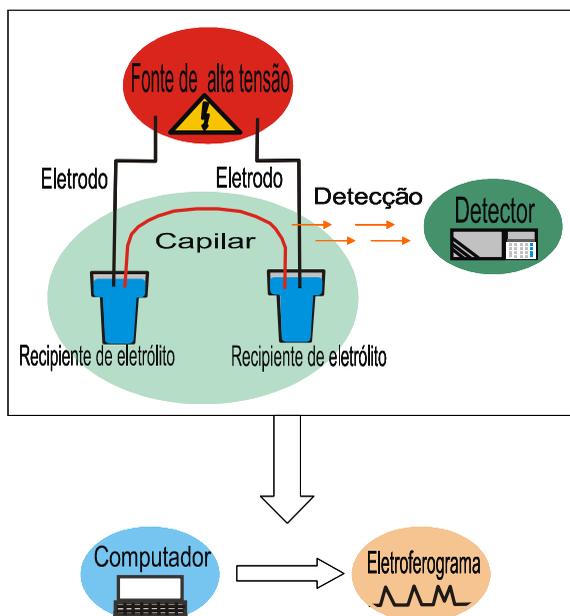


Figura 1.1. Diagrama esquemático de um instrumento de eletroforese capilar.

Em EC, a amostra pode ser injetada de forma eletrocínética ou hidrodinâmica. Na injeção eletrocínética a amostra é introduzida no

capilar devido a uma variação de potencial que se forma ao longo do tubo. Como consequência, a quantidade de material injetado é uma função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e do eletrólito e da grandeza do fluxo eletrosmótico. No modo de injeção hidrodinâmica, a amostra é introduzida no capilar por uma diferença de pressão (pressão positiva, vácuo, sifonagem) que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar, sendo assim, o volume injetado depende do tempo de injeção, dimensões do capilar e viscosidade da solução tampão [34].

O detector mais freqüentemente utilizado em EC é o espectrofotômetro de absorção no UV/Vis, pois ele é versátil, barato e atende a um leque considerável de substâncias de interesse. A maioria dos instrumentos também possui detectores com arranjo de diodos disponíveis, o qual pode fornecer um espectro de UV/Vis para substâncias que apresentam absorvidade molar compatível [34]. Na Tabela 1.1, são mostrados alguns tipos de detectores e seus limites de detecção.

Tabela 1.1. Detectores para Eletroforese Capilar [36].

Tipo de Detector		Limite de Detecção Típico (em mol L ⁻¹)
Índice de Refração	Direto (laser)	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶
	Condutividade	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶
Absorbância	Direto	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶
	Indireto	10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁵
Fluorescência	Direto (lâmpada)	10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁸
	Direto (laser)	10 ⁻⁹ – 10 ⁻¹²
	Indireto	10 ⁻⁶ – 10 ⁻⁷
Espectrometria de Massas		10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁹

1.1.3.2 Fundamentação teórica

Conforme o tipo de analito presente na amostra, cada componente se desloca com uma mobilidade característica e, devido aos diferentes tipos de mobilidades existentes, cada uma recebe uma denominação correspondente, a saber:

- mobilidade iônica: é a mobilidade do íon totalmente dissociado à diluição infinita;
- mobilidade efetiva: é a mobilidade de um íon num determinado pH;

- mobilidade eletrosmótica: é o valor da mobilidade do fluxo eletrosmótico (FEO);
- mobilidade aparente: é a mobilidade obtida diretamente de um eletroferograma [29,34].

A mobilidade iônica ou eletroforética (μ_e) é diretamente proporcional à carga (q) e inversamente proporcional ao raio hidratado (r) e a viscosidade do meio (η), conforme pode ser observado na Equação 1.1:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.1)$$

Com a aplicação da tensão, as espécies carregadas adquirem velocidades eletroforéticas (v_e) dependentes do campo elétrico (E) gerado no capilar e da mobilidade eletroforética (μ_e) de cada espécie (Equação 1.2).

$$v_e = \mu_e E \quad (1.2)$$

A (μ_e) pode apresentar variações em seus valores para uma mesma espécie dependendo do eletrólito de corrida utilizado na separação. Neste momento, introduz-se o conceito de mobilidade efetiva (μ_{ef}) formulado a partir da função de distribuição das espécies (α), conforme a Equação 1.3:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_e \quad (1.3)$$

O conceito de mobilidade efetiva é muito importante, pois a resolução entre dois analitos com mobilidades muito próximas em uma determinada matriz é obtida através da escolha adequada dos componentes do eletrólito de corrida e, conseqüentemente, do seu pH ou pela adição de alguma substância ao eletrólito de corrida, bastando que os pK_a s das espécies de interesse sejam diferentes para que se promova a separação com uma boa seletividade.

Além da mobilidade, outro fenômeno responsável pela separação das substâncias em EC é o fluxo eletrosmótico.

O capilar é constituído de sílica fundida, nesse material existem grupos silanóis (SiOH) que, em um determinado intervalo de pH se ionizam, deixando as paredes do capilar carregadas negativamente e cargas positivas livres em solução, para manter a eletroneutralidade dentro do tubo, uma camada de cátions formada pelos contra-íons do eletrólito de corrida se adere à parede do capilar, resultando em um fenômeno de dupla camada elétrica. A concentração de íons de carga o-

posta na superfície diminui com a distância da parede e, esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica [29].

Quando um campo elétrico é gerado no capilar, a camada difusa é afetada por forças elétricas e começa a migração dos íons em direção aos eletrodos de carga oposta; como esses íons estão solvatados por moléculas de água, esse deslocamento promove um fluxo de solução chamado fluxo eletrosmótico (Figura 1.2). Esse fluxo é o responsável por arrastar os analitos, independentemente de suas cargas, em direção ao detector [29].

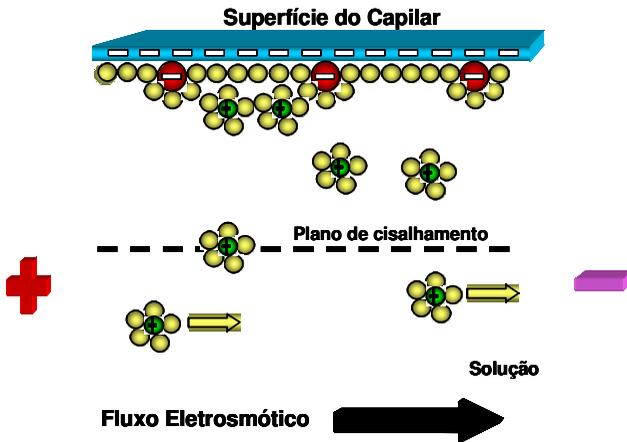


Figura 1.2. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.

A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser mensurada em termos de velocidade ou mobilidade segundo as Equações 1.5 e 1.6 [37, 38].

$$v_{osm} = - \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (1.4)$$

$$\mu_{osm} = - \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (1.5)$$

Onde:

v_{osm} = velocidade do FEO;

ϵ_0 = permissividade ao vácuo;

ϵ = constante dielétrica;

ζ = potencial zeta;
 η = viscosidade;
 E = potencial aplicado;
 μ_{feo} = mobilidade do FEO.

De acordo com estas expressões, o fluxo eletrosmótico é diretamente proporcional ao potencial zeta (ζ), uma vez que, as outras incógnitas são constantes físicas. O potencial zeta é uma diferença de potencial existente muito próxima à superfície do capilar, gerada a partir da dupla camada elétrica. Este depende da carga na superfície da parede do capilar e a carga depende do pH, sendo assim, o FEO é diretamente proporcional ao pH do eletrólito [37]. Abaixo de pH 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO não é significativo, enquanto que acima de pH 8 os grupamentos silanóis ficam completamente ionizados e portanto o FEO é considerado alto [39].

O potencial zeta é gerado em todo o comprimento do capilar e produz uma velocidade de fluxo uniforme sem geração de pressão. Sendo assim, pode-se dizer que o perfil do FEO é planar e esta característica faz com que a EC não promova o alargamento dos picos em razão do fluxo, pois os analitos se movem com velocidades muito próximas (Figura 1.3). Esta é uma importante vantagem da EC quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) em relação a eficiência dos picos, uma vez que, o perfil parabólico do fluxo, induzido por pressão, (fluxo laminar) contribui para picos mais largos [29].



Figura 1.3. Perfil de fluxo gerado por pressão (A) e o fluxo eletrosmótico (B).

Em EC, existem dois modos de análise: o co-eletrosmótico (em que os analitos migram na mesma direção e sentido do FEO) e o contra-eletrosmótico (os analitos migram na mesma direção, mas em sentido oposto ao FEO) [40].

Com a existência do FEO fica claro que a migração das espécies em EC não depende apenas das próprias mobilidades eletroforéticas,

mas também da mobilidade do fluxo eletrosmótico e, esta por sua vez, depende da escolha da composição do eletrólito condutor.

1.1.3.3 Técnicas de pré-concentração

Como mencionado anteriormente, a eletroforese capilar oferece várias características atrativas como técnica analítica para a verificação da autenticidade de bebidas. Porém, as metodologias desenvolvidas por EC têm frequentemente a sua detectabilidade diminuída em comparação a outros métodos de separação, tal como HPLC, devido ao limitado caminho óptico proporcionado pelo capilar para a detecção espectrofotométrica, e aos pequenos volumes de amostras que podem ser injetados. Visando melhorar a sensibilidade da técnica, muitos estudos têm investigado diferentes estratégias de pré-concentração. Entre eles, “stacking” tem sido extensivamente descrito na literatura e tem se mostrado como um método eficiente para aumentar a detectabilidade em EC [32].

A pré-concentração “on-line” ocorre quando um volume de amostra maior do que o convencional é introduzido no capilar e os analitos que estão em uma longa zona da amostra são focalizados em uma estreita zona antes da separação. O princípio da maioria das técnicas de pré-concentração realizados em eletroforese capilar de zona é baseado na mudança de velocidade dos analitos entre a zona da amostra e a zona do eletrólito carreador. Esta mudança na velocidade de migração é causada pela mudança na intensidade do campo elétrico entre a zona da amostra e a zona de separação ou pela mudança na carga efetiva do analito [41-47].

Entre as técnicas de pré-concentração “on-line” mais utilizadas estão:

- NSM (“Normal stacking mode”): a amostra, numa matriz de baixa condutividade elétrica é introduzida hidrodinamicamente no capilar como uma longa zona de amostra, então a tensão é aplicada sem quaisquer procedimentos adicionais. A quantidade de amostra injetada deve ser reduzida, para manter a eficiência da separação alta. Se o fluxo eletrosmótico é suprimido, a eficiência na pré-concentração é maior do que com o fluxo alto. É a mais simples entre os modos de “stacking”, e o ganho na concentração é de cerca de 10 vezes [32].
- SWMR (“Stacking with matrix removal”): neste modo de “stacking”, a matriz da amostra deve ser removida do capilar antes da separação eletroforética. Por exemplo, para a pré-concentração de ânions sob um alto e positivo fluxo eletrosmótico (na direção do cátodo), primeiro é

aplicada uma tensão, com polaridade negativa, para a remoção da matriz da amostra. Quando a corrente atinge 90 a 99 % da corrente observada, quando todo o capilar é preenchido apenas com o eletrólito de corrida, a polaridade é invertida e a separação ocorre. Para que a pré-concentração seja eficiente, a velocidade eletroforética dos analitos deve ser maior que a velocidade do fluxo, isto acontece devido a intensidade do campo elétrico na zona da amostra ser maior que na zona do eletrólito. Com este "stacking", a eficiência da pré-concentração pode chegar a mais de 100 vezes [32].

1.1.4 Referências bibliográficas

[1] KENNEDY, J. F.; MEULLENET, F. Whisky: Technology, Production and Marketing. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 359, 2004.

[2] BRASIL. Decreto n. 2314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Lex**: Diário Oficial da União, Brasília, 05 de setembro de 1997.

[3] BEEK, S. van; PRIEST, F. G. Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5322-5328, 2000.

[4] BEEK, S. van; PRIEST, F. G. Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: a Polyphasic Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 297-305, 2002.

[5] BALDWIN, S.; BLACK, R. A.; ANDREASEN, A. A.; ADAMS, S. L. Aromatic Congener Formation in Maturation of Alcoholic Distillates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, p. 381-385, 1967.

[6] Nishimura, K.; Matsuyama, R. Maturation and maturation chemistry. In: Longma Scientific & technical (ed), **The Science and Technology of Whiskies**, p. 210, 1989.

[7] LEE, K. Y. M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R.; RICHARDSON, G. D. Sensory discrimination of blended Scotch whiskies of different product categories. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 109-117, 2001.

- [8] REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, p.283-289, 1981.
- [9] NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 21, p. 735-739, 1998.
- [10] LIMA NETO, B. S.; BEZERRA, C. W. B.; POLASTRO, L. R.; CAMPOS, P.; NASCIMENTO, O. R., FURUYA, S. M. B.; FRANCO, D. W. Cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. **Química Nova**, v. 17, p. 220-223, 1994.
- [11] CHEN, C. L. Constituents of *Quercus alba*. **Phytochemistry**, v. 9, p.1149, 1970.
- [12] CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D. Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and european oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for production of barrels used in barrel aging wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, p.79-85, 1998.
- [13] MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverage. **Food Science & Technology**, v. 9, p. 95-101, 1998.
- [14] CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J.B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.2, p.169-175, 1998.
- [15] LIEBMANN, A. J.; ROSENBLATT, M. Changes in whisky while maturation. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 994-1002, 1943.
- [16] BELLRI, M.; DOMENICO, R.; NICOLI, S.; FRANCO, C.; FORTI, L.; VANNINI, V.; STIVALA, L. A.; PRESTA, P. Antiangiogenic and Vascular-Targeting Activity of the Microtubule-Destabilizing *trans*-Resveratrol Derivative 3,5,4-Trimethoxystilbene. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1451-1459, 2005.

- [17] SENGOTTUVELLAN, M.; VISWANATHAN, P.; NALINI, N. Chemopreventive effect of trans-resveratrol – a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 125-132, 1995.
- [18] MINISTÉRIO DA FAZENDA. **Receita Federal**. Receita divulga balanço das apreensões de Foz do Iguaçu em novembro. Disponível em: http://www.receita.fazenda.gov.br/automaticosrfsinot/2009/12/11/2009_12_11_15_02_26_303985760.html. Acesso em: 04 de janeiro de 2010.
- [19] COSTA, R. S.; SANTOS, S. R. B.; ALMEIDA, L. F.; NASCIMENTO, E. C. L.; PONTES, M. J. C.; LIMA, R. A. C.; SIMÕES, S. S.; ARAÚJO, M. C. U. A novel strategy to verification of adulteration in alcoholic beverages based on Schlieren effect measurements and chemometric techniques. **Microchemical Journal**, v. 78, p. 27-34, 2004.
- [20] HERZOG, Débora. Bares e boates da Grande Vitória eram abastecidos com whisky falsificado. **Folha Vitória**, Vitória, 19 de maio de 2009. Disponível em: <<http://www.folhavitoria.com.br/>>. Acesso em: 28 de outubro de 2009.
- [21] GROTTI, B. M.; MARCHIORI, R. Polícia Civil prende fabricante de whisky falsificado. Disponível em: http://www.ssp.sp.gov.br/home/noticia.aspx?cod_noticia=14783/. Acesso em: 28 de outubro de 2009.
- [22] NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 39-42, 2001.
- [23] BLINDER, F.; VOGES, E.; LAUGE, P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. **Food Additives Contam**, v. 5, n. 3, p. 343-351, 1988.
- [24] BRUN, S. ; CABANIS, J. C. Sécurité alimentaires en matière de vin. **Ann Fals Exp. Chim.**, v. 86, p. 9-16, 1993.

- [25] GOSSELIN, R. E.; HODGE, H. C.; SMITH, R. P.; GLEASON, M. N. Toxicology of Commercial Products. The Williams & Wilkins Co. (ed.), p. 229-233, 1976.
- [26] BADOLATO, E. S. G.; AUED-PIMENTEL, S.; DURAN, M. C.; NAGATO, L. A. F. Falsificação de uísques no Estado de São Paulo. **Bol. IAL**, v. 3, n. 1, 1993.
- [27] PONTES, M. J. C.; SANTOS, S. R. B.; ARAÚJO, M. C. U.; ALMEIDA, L. F.; LIMA, R. A. C.; GAIÃO, E. N.; SOUTO, U. T. C. P. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. **Food Research International**, v. 39, p. 182-186, 2006.
- [28] GONZÁLEZ-ARJONA, D.; GONZÁLEZ-GALLERO, V.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 381, p. 257-264, 1999.
- [29] TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- [30] JIMIDAR, M. Electromigration methods: origins, principles and applications. In: S. Ahuja e N. Jespersen (ed), **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 47, p. 572-623, 2006.
- [31] SCHMITT-KOPPLIN, P.; FEKETE, A. The CE way of thinking: "All is Relative!" In: P. Schmitt-Kopplin (ed), **Methods in Molecular Biology: Capillary Electrophoresis**, v. 384, p.612, 2008.
- [32] SIMPSON, S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 509, 2008.
- [33] SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.
- [34] LANDER, J. P. Introduction to Capillary Electrophoresis. In: James P. Lander (ed), **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**, p.30, 2008.

- [35] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. Capillary Electrophoresis and electrochromatography. **Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques**, p. 147, 2007.
- [36] EWING, A. G.; WALLINGFORD, R. A.; OLEFIROWICZ, T. M. Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 292A, 1989.
- [37] SCHWER, C.; KENNDLER, E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the potential zeta. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1801-1807, 1991.
- [38] KIRBY, B.J.; HASSELBRINK JR, E.F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, p. 187-202, 2004.
- [39] HAYES, M.A.; EWING, A.G. Electroosmotic flow control and monitoring with an applied radial voltage for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 512-516, 1992.
- [40] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- [41] SAFRA, J.; POSPISILOVA, M.; KAVALIROVA, A. Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1022-1024, 2006.
- [42] MALA, Z.; KRIVANKOVA, L.; GEBAUER, P.; BOCEK, P. Contemporary sample stacking in CE: A sophisticated tool based on simple principles. **Electrophoresis**, v. 28, p. 243-253, 2007.
- [43] OSBOURN, D. M.; WEISS, D. J.; LUNTE, C. E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2768-2779, 2000.
- [44] BREADMORE, M. C. Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips. **Electrophoresis**, v. 28, p. 254-281, 2007.

[45] BREADMORE, M. C.; HADDAD, P. R. Approaches to enhancing the sensitivity of capillary electrophoresis methods for the determination of inorganic and small organic anions. **Electrophoresis** v. 22, p. 2464-2489, 2001.

[46] LIN, C. H.; KANETA, T. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. **Electrophoresis**, v. 25, p. 4058-4073, 2004.

[47] TIMERBAEV, A. R.; HIROKAWA, T. Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices. **Electrophoresis**, v. 27, p. 323-340, 2006.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a viabilidade de utilização da eletroforese capilar como metodologia para investigar a autenticidade de uísques nacionais e importados, através do desenvolvimento e da otimização de métodos analíticos que possibilitem a identificação de compostos marcadores.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de métodos rápidos, de baixo custo e eficiência satisfatória para diferenciação de uísques apreendidos por suspeita de falsificação de uísques autênticos.
- Otimização da composição do eletrólito de corrida e parâmetros instrumentais de separação.
- Utilização de ferramentas de simulação para auxiliar na otimização das condições analíticas de separação.
- Identificação, caso possível, dos componentes que comprovem a autenticidade da bebida, através da utilização de padrões analíticos autênticos e do espectro de UV-Vis dos compostos, especificamente, aldeídos fenólicos, ácidos alifáticos e açúcares.

Capítulo II

**Análise de aldeídos fenólicos em amostras de uísque
mediante uso de “stacking”**

2.1 Introdução

Através do contato do uísque com a superfície do barril de carvalho, muitas substâncias são incorporadas ao destilado durante o envelhecimento. Estas substâncias tanto podem ser extraídas diretamente da madeira dos tonéis, como podem se originar da degradação de moléculas formadoras da parede celular, como por exemplo, a lignina, a celulose e a hemicelulose. Independentemente da via como são associados ao destilado, estes compostos sofrem complexas mudanças químicas durante a maturação, modificando as propriedades organolépticas da bebida [1-4].

Entre estas transformações químicas, pode ser citada a etanólise, que ocorre com a lignina da madeira, levando à formação de aldeídos cinâmicos e compostos do tipo siringil [5].

A hidrólise de ligninas do tipo guaiacil e siringil, assim como, de lactonas (*cis*- e *trans*- β -metil- γ -octalactona), originam os ácidos vanílico e sergíngico e, também, os aldeídos fenólicos sinapaldeído, siringaldeído, coniferaldeído e vanilina, Figura 2.1 [2, 4, 6, 7].

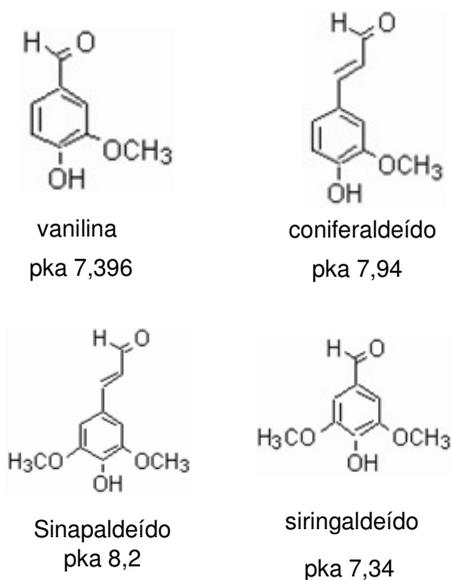


Figura 2.1. Estruturas dos aldeídos fenólicos determinados no presente estudo e seus respectivos pKas [8].

Entre os produtos que se originam da quebra da lignina, a vanilina é a principal responsável pelo aroma das bebidas envelhecidas em barris de madeira [9].

A determinação da composição química dos uísques pode ser empregada para o estudo dos processos envolvidos na sua produção, para determinação da qualidade e para verificação de sua autenticidade, pois, se espera que a composição de um produto falso ou adulterado seja diferente da sua correspondente amostra autêntica [10,11].

O presente estudo teve por objetivo desenvolver uma metodologia utilizando EC para a determinação de aldeídos fenólicos em amostras de uísque, visando monitorar a concentração destas substâncias em amostras autênticas e apreendidas por suspeita de falsificação. Estratégias de pré-concentração “on-line” (“stacking”) foram empregadas para aumentar a detectabilidade do método.

2.2 Procedimento experimental

2.2.1 Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP^{3D}CE da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.U.A.) equipado com um detector de arranjo de diodos ajustado em 360 nm (vanilina e seringaldeído) e 410 nm (coniferaldeído e sinapaldeído), respectivamente.

As medidas foram realizadas a 25°C em um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato (48,5 cm × 75 µm D. I. × 365 µm D. E.) adquirido na Microtube (São Paulo, Brasil). O capilar foi, primeiramente, condicionado com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ e água desionizada por 30 min cada e com eletrólito de corrida por 10 min. A cada dia, antes do início das análises, o capilar também foi lavado com hidróxido de sódio, água desionizada e com eletrólito de corrida por 5 min cada. Entre as determinações o capilar foi condicionado durante 1 min com o eletrólito de corrida.

As soluções contendo os padrões e as amostras foram introduzidas pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”) e injetadas hidrodinamicamente sob pressão de 50 mbar (50 mbar = 4996.2 Pa).

A tensão aplicada para a separação foi de 25 kV, com polaridade positiva no lado da injeção.

A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o programa HP Chemstation.

2.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados na preparação do tampão são de grau analítico. Tetraborato de sódio (TBS) foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e metanol (MeOH) foi adquirido da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). Os padrões de vanilina, seringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído foram obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

Água desionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) foi utilizada no preparo das soluções. Uma solução padrão estoque (20 mg L^{-1}) dos aldeídos foi preparada em água desionizada, dissolvendo estes compostos em um volume de 10 mL, contendo 40 % (v/v) de etanol.

Uma solução estoque de TBS (colocada em equipamento de ultra-som e banho termostatizado para a dissolução do sal) na concentração de 100 mmol L^{-1} foi utilizada para a preparação do eletrólito de corrida.

2.2.3 Amostras

2.2.3.1 Procedência das amostras

Para este trabalho, 30 amostras de uísque foram utilizadas, sendo que 29 amostras foram gentilmente cedidas pela Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo e uma foi adquirida no comércio local.

2.2.3.2 Preparação das amostras

As amostras de uísque foram transferidas diretamente para os reservatórios de amostra antes da injeção no equipamento de EC, sem nenhum tratamento prévio.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Otimização do eletrólito de corrida

Pelo fato do pK_a dos analitos estudados variar de 7,0 a 8,5 [8], foi escolhido TBS, pH 9,3, como eletrólito de corrida, pois neste pH, os compostos de interesse estão na forma aniônica e quase totalmente dissociados. Como apresentam valores de mobilidade eletroforética meno-

res que a mobilidade do fluxo eletrosmótico, a análise é conduzida no modo contra-eletrosmótico.

Para otimização da composição do eletrólito de corrida utilizado no método desenvolvido para eletroforese capilar de zona, a concentração de TBS a ser utilizada foi variada entre 10 e 20 mmol L⁻¹, pois concentrações menores do que 10 mmol L⁻¹ não apresentam uma boa capacidade tamponante e concentrações acima de 20 mmol L⁻¹, provocam uma corrente elétrica elevada. A porcentagem de MeOH avaliada foi de 0, 10 e 20 %. Este estudo foi realizado com uma solução padrão contendo 10 mg L⁻¹ dos aldeídos aromáticos preparada em EtOH:água (40:60, v/v) a fim de mimetizar a matriz do uísque, e também com uma amostra de uísque autêntica, gerando uma combinação de seis resultados, cujos eletroferogramas são apresentados na Figura 2.2. A fim de minimizar o tempo de análise, optou-se pela injeção hidrodinâmica, na extremidade do capilar mais próxima ao detector (injeção pelo “outlet”).

De acordo com os eletroferogramas D e E, quadro II na Figura 2.2, optou-se pela concentração de 20 mmol L⁻¹ de TBS como tampão porque este valor apresentou ganhos na resolução e eficiência das bandas eletroforéticas na amostra.

Observando-se os eletroferogramas D, E, F, nos quadros I e II, percebe-se que o aumento do teor de metanol diminui a eficiência dos picos. Entretanto, com a utilização de 10 % do solvente orgânico, há um ganho em resolução entre os analitos, tanto nos padrões quanto na amostra (eletroferogramas E), possibilitando a identificação do composto 2 (coniferaldeído) na amostra de uísque. No entanto, a adição de 20 % de MeOH provocou um considerável alargamento das bandas (eletroferogramas F).

O eletrólito de corrida considerado satisfatório para a separação dos analitos foi constituído por 20 mmol L⁻¹ TBS com 10 % MeOH. Este eletrólito apresentou bons resultados em relação ao tempo de análise, formato do pico, resolução e corrente elétrica, adequados para a separação eletroforética.

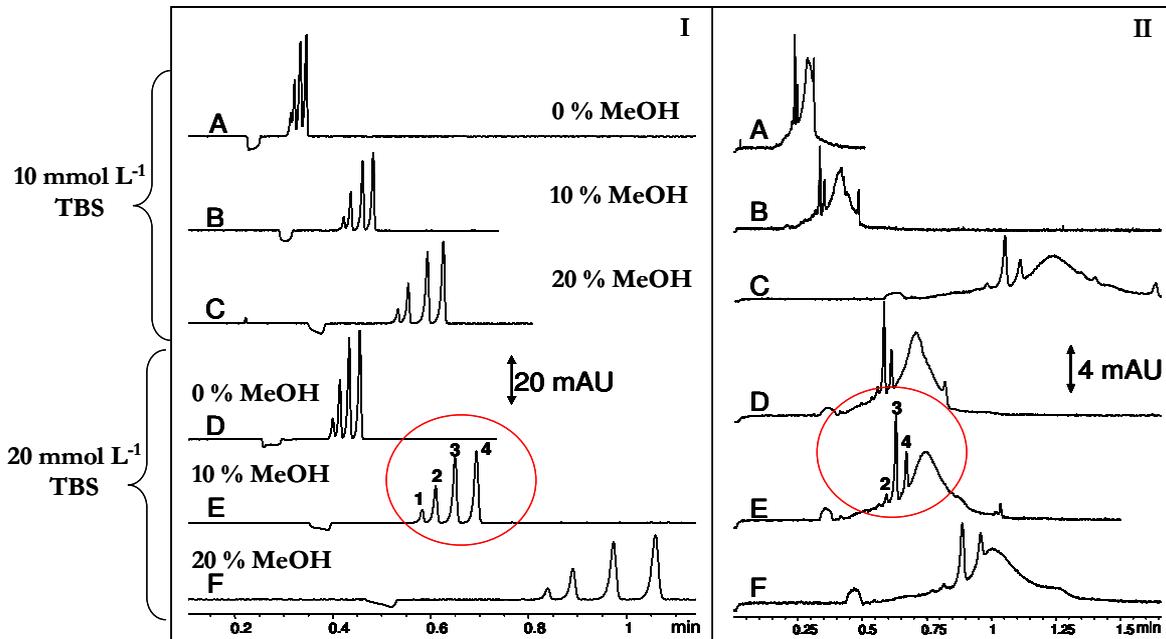


Figura 2.2. Otimização da composição do eletrólito de corrida. I: eletroferograma de uma solução padrão (10 mg L⁻¹) de sinaldeído (1), coniferaldeído (2), seringaldeído (3) e vanilina (4), em 360 nm. II: eletroferogramas de uma amostra de uísque autêntico, em 360 nm. Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm; $L_{\text{det}} = 8,5$ cm; D. I. = 75 μm); tensão 25kV (polaridade positiva na injeção); temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s.

A injeção das amostras pela extremidade mais próxima ao detector mostrou a possibilidade de diferenciação de amostras de uísque suspeitas de adulteração das amostras autênticas. Como pode ser observado nas Figuras 2.3 e 2.4, na amostra de uísque autêntica é possível identificar as bandas dos aldeídos fenólicos (B) e ausência dos mesmos na amostra apreendida por suspeita de adulteração (A).

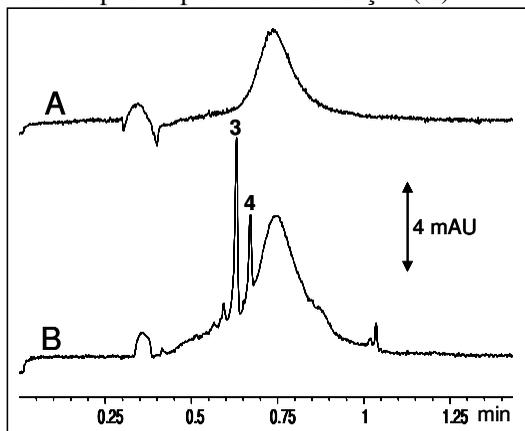


Figura 2.3. Eletroferogramas de uma amostra suspeita de adulteração (A) e de um uísque autêntico (B), em 360 nm. 3: seringaldeído, 4: vanilina. Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm; $L_{\text{det}} = 8,5$ cm; D. I. = $75 \mu\text{m}$); tensão 25kV (polaridade positiva na injeção); temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica 50 mbar/3 s. Eletrólito: 20 mmol L^{-1} TBS e 10 % MeOH, pH 9,3.

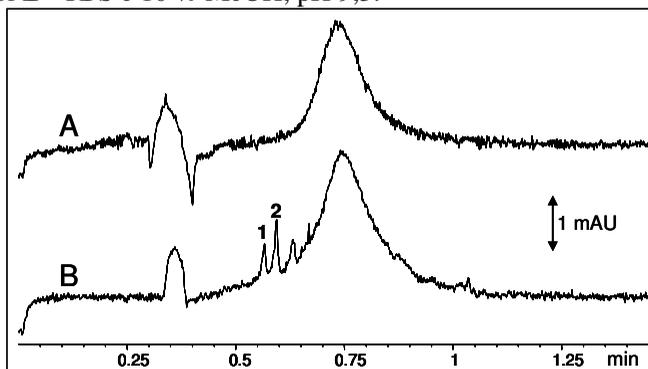


Figura 2.4. Eletroferogramas de uma amostra de uísque suspeita de adulteração (A) e de um uísque autêntico (B), em 410 nm. 1: sinapaldeído, 2: coniferaldeído. Condições experimentais, idem Figura 2.3.

Uma vez que a relação sinal/ruído do coniferaldeído (pico 2), e do sinapaldeído (pico 1) é inferior a dez, a quantificação nas amostras se torna impossibilitada. Para tentar aumentar a detectabilidade dos aldeídos no método, o tempo de injeção foi aumentado para 6 e 9 segundos.

Na Figura 2.5, é possível notar que a estratégia empregada não foi eficiente, pois ocorreu a co-migração dos analitos.

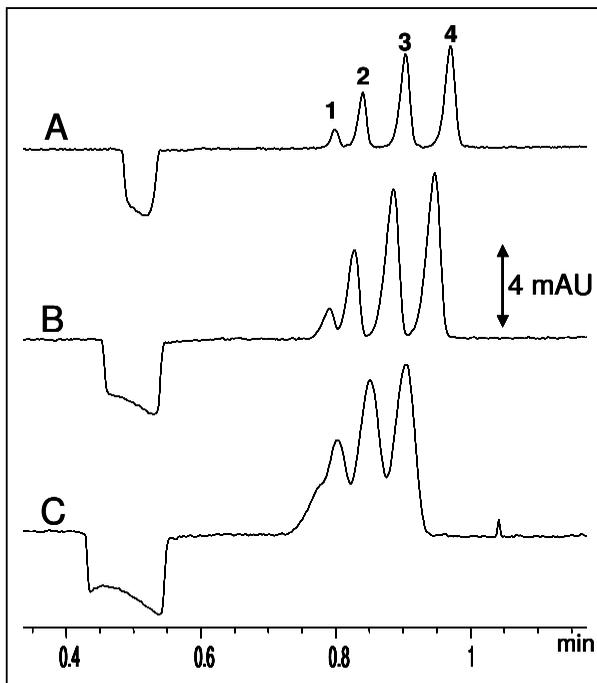


Figura 2.5. Variação no tempo de injeção de uma solução contendo os padrões de aldeídos fenólicos 1 mg L^{-1} , em 360 nm . A: 3 s. B: 6 s. C: 9 s. 1: sinapaldeído, 2: coniferaldeído, 3: seringaldeído, 4: vanilina. Condições experimentais, idem Figura 2.3.

Tendo em vista que o aumento no tempo de injeção diminuiu a resolução entre os analitos e, a fim de melhorar a detectabilidade do método, optou-se então pela injeção das amostras e dos padrões pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”), aumentando assim o L_{det} . Estas análises ocorreram em um tempo mais longo, observando-se um aumento de eficiência e resolução (Figura 2.6).

2.3.2 Estratégias de pré-concentração “on line”

2.3.2.1 “Normal stacking mode”

Utilizando o mesmo eletrólito de corrida, considerado ótimo para a análise pelo método *outlet*, e a mesma tensão aplicada (25 kV), variou-se o tempo de injeção de 3 a 15 segundos no modo normal de injeção, utilizando-se, nestes testes, uma solução padrão dos aldeídos fenólicos na concentração de 2 mg L⁻¹.

O tempo de injeção para que fossem obtidos picos com maior sinal analítico sem perda de eficiência entre eles foi de 9 s com pressão de 50 mbar (em torno de 3,7 % do volume do capilar). A Figura 2.6 mostra o eletroferograma obtido usando a metodologia NSM desenvolvida. Nesta Figura pode ser observado que uma boa resolução foi alcançada para os analitos em menos de 4 minutos.

Para a determinação da vanilina e do siringaldeído foi utilizado o comprimento de onda de 360 nm e, para o coniferaldeído e o sinapaldeído 410 nm, a fim de maximizar o sinal analítico e a seletividade (espectros de UV estão inseridos na Figura 2.6).

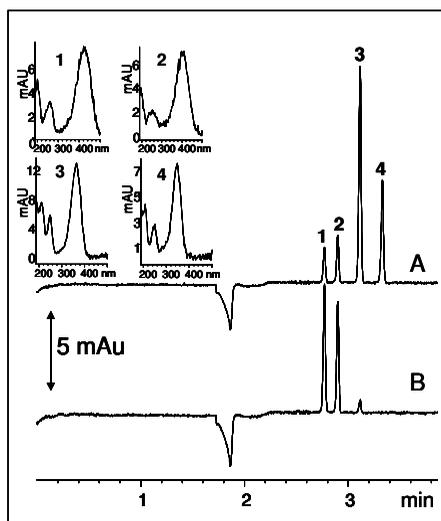


Figura 2.6. Eletroferograma de uma solução padrão (2 mg L⁻¹) de sinapaldeído (1), coniferaldeído (2), siringaldeído (3) e vanilina (4). A: $\lambda = 360$ nm. B: $\lambda = 410$ nm. Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm; $L_{\text{det}} = 40$ cm; D. I. = 75 μm); tensão 25kV (polaridade positiva na injeção); temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica 50 mbar/9 s. Eletrólito: 20 mmol L⁻¹ TBS e 10 % MeOH, pH 9,3.

A Figura 2.7 compara o eletroferograma de um uísque autêntico com o de uma amostra apreendida, nos dois comprimentos de onda de interesse, utilizando o método desenvolvido. Como pode ser observado, há uma considerável diferença no perfil eletroforético das duas amostras e a ausência de picos relacionados aos analitos estudados na amostra apreendida, sugerindo que esta tenha sofrido adulteração.

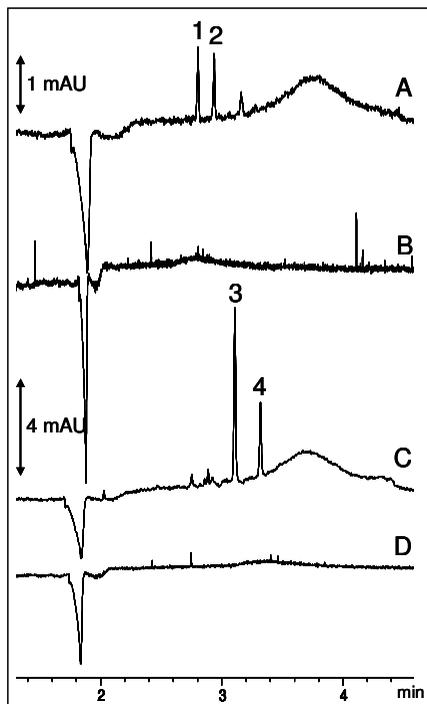


Figura 2.7. Eletroferogramas de um uísque autêntico (A e C) e de uma amostra suspeita de adulteração (B e D), nos comprimentos de onda dos compostos determinados: sinapaldeído (1) e coniferaldeído (2) em 410 nm. seringaldeído (3) e vanilina (4) em 360 nm. Condições experimentais, idem Figura 2.6.

2.3.2.2 “Stacking with matrix removal”

No pH do eletrólito otimizado há um alto fluxo eletrosmótico catódico. Com isso, a estratégia utilizada para aumentar a detectabilidade foi baseada na pré-concentração da amostra durante a injeção, denominada “stacking with matrix removal” (SWMR). Primeiramente, um

grande volume de amostra é injetado hidrodinamicamente no capilar (10 – 240 s x 50 mbar), como ilustrado na Figura 2.8 (A). Então, uma tensão negativa (-15 KV) foi aplicada para remover a matriz da amostra (Figura 2.8 (B) e a polaridade foi invertida, quando a corrente alcançou 95% do valor da corrente observada na presença do eletrólito de corrida (-37 μ A, quando a polaridade negativa está sendo aplicada), (Figura 2.8 (C e D)).

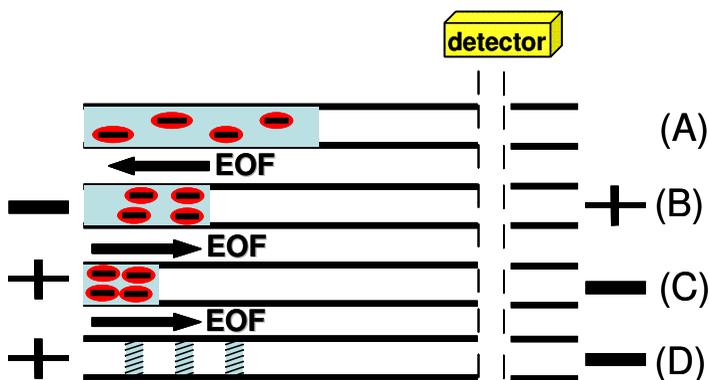


Figura 2.8. Ilustração do fenômeno de “stacking” no modo de pré-concentração “on-line” denominada SWMR.

A Figura 2.9A exibe o gráfico da corrente *versus* tempo sob as condições de estudo, onde é possível observar que o aumento da detectabilidade é proporcional ao tempo de introdução da amostra no capilar. Portanto, além do tempo de injeção, há um aumento no tempo requerido para a corrente alcançar 95% do valor total e para a separação ser iniciada.

A Figura 2.9B mostra o gráfico de altura (H) *versus* tempo de injeção (t_{inj}) para uma amostra de uísque autêntica. Como pode ser observado, o sinal máximo foi obtido em 120 segundos de injeção hidrodinâmica (SWMR120), em torno de 50% do volume do capilar. Usando um tempo de injeção maior, houve um decréscimo na altura do pico na detecção do seringaldeído, devido à diminuição da eficiência, mas a altura dos picos dos outros componentes permaneceu constante.

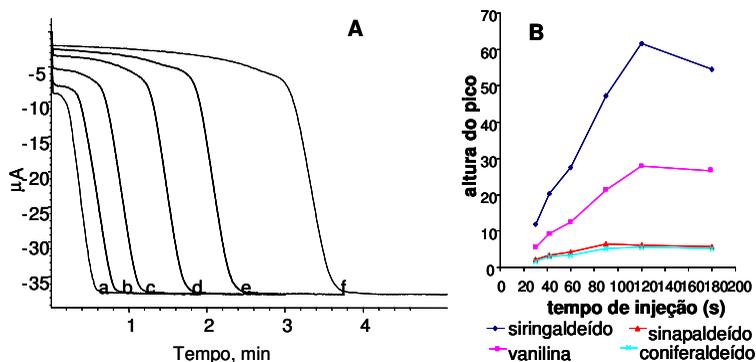


Figura 2.9. Variação do tempo de injeção hidrodinâmica. A – Perfil da corrente elétrica durante o procedimento de SWMR. (a = 30; b = 42; c = 60; d = 90; e = 120; f = 180 segundos). B – Altura do pico *versus* tempo de injeção usando SWMR. Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm; $L_{\text{det}} = 40$ cm; D. I. = $75 \mu\text{m}$); tensão 25kV (polaridade positiva na injeção); temperatura 25°C ; injeção hidrodinâmica 50 mbar. Eletrolito: 20 mmol L^{-1} TBS e 10 % MeOH, pH 9,3.

A fim de avaliar o desempenho do método SWMR120, dois tipos de amostras foram analisadas: uma amostra de uísque suspeita de adulteração, com e sem adição dos analitos, e uma solução padrão preparada em uma mistura EtOH:água (40:60 v/v). A Figura 2.10 apresenta os eletroferogramas obtidos.

Na Figura 2.10A observa-se que na amostra de uísque suspeita de adulteração não foi possível detectar a presença dos analitos estudados. A Figura 2.10B mostra os resultados para a adição de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, onde é possível visualizar o formato simétrico dos picos, assim como, a boa resolução e sensibilidade do método. A Figura 2.10C mostra a análise da solução composta de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ das substâncias preparadas em uma mistura EtOH:água. Há um decréscimo na eficiência dos picos, quando as substâncias são diluídas em solvente, causada pela diferença na composição da matriz.

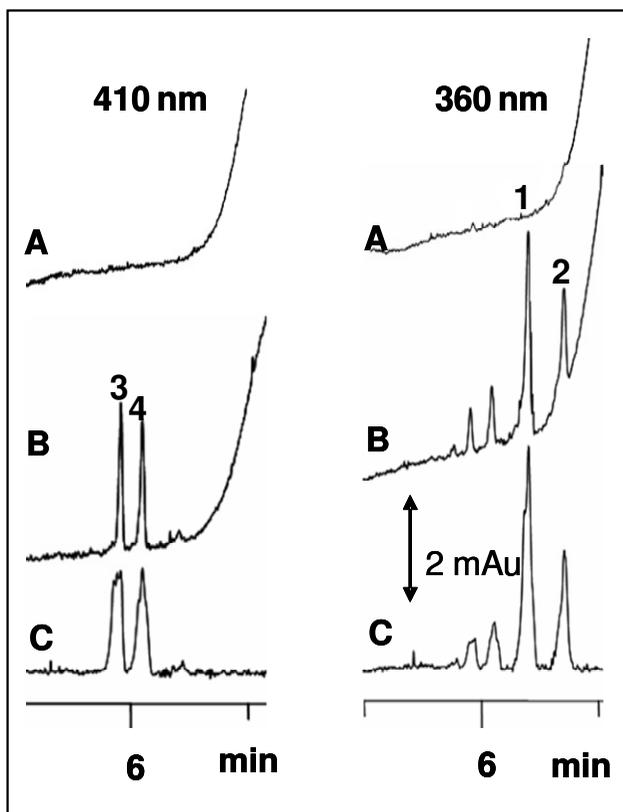


Figura 2.10. Eletroferogramas. (A) Amostra suspeita de adulteração sem adição de padrão. (B) Amostra suspeita de adulteração com adição dos padrões dos quatro aldeídos fenólicos ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). (C) Amostra simulada com EtOH:H₂O (40:60, v/v) e adição de padrão ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). Identificação dos picos: seringaldeído (1), vanilina (2), sinapaldeído (3) e coniferaldeído (4). Condições experimentais, idem Figura 2.6.

A fim de verificar o efeito de matriz, curvas de calibração foram construídas pela adição de padrão utilizando as amostras de uísque suspeitas de adulteração. Estas curvas foram comparadas com as curvas construídas com solvente (EtOH:água, 40:60, v/v). Os coeficientes angulares obtidos foram estatisticamente diferentes. Desse modo, conclu-

iu-se que a quantificação usando o método SWMR120 deve ser realizada pelo método de adição de padrão devido a efeitos de matriz.

Com a redução no tempo de injeção hidrodinâmica, uma significativa diminuição nos efeitos de matriz foi verificada. O maior tempo de injeção utilizado, sem uma apreciável redução na eficiência dos picos, foi 42 segundos de injeção hidrodinâmica (SWMR42). As curvas de calibração construídas pelo método de adição de padrão aplicadas a diferentes amostras e à mistura EtOH:água (40:60, v/v) não apresentaram significativas diferenças, indicando a possibilidade do uso de calibração externa com este método.

A Figura 2.11 mostra os eletroferogramas obtidos da análise da amostra de uísque A3 usando as três diferentes estratégias de pré-concentração estudadas. Um considerável aumento no sinal pode ser observado na ordem dos eletroferogramas obtidos nos métodos NSM, SWMR42 e SWMR120, respectivamente. O tempo total para a introdução da amostra considerando a troca de reservatórios foi 20, 150, 300 segundos, respectivamente. O tempo de análise aumentou devido ao tempo gasto para a inversão da polaridade, que pode ser visualizado no registro da corrente elétrica, e através de um degrau na linha de base. A marca do FEO (degrau na linha) causado pelo plugue do solvente injetado, diminuiu quando o plugue de amostra foi removido do capilar. Esta observação pode ser comprovada pela comparação do sinal apresentado pela Figura 2.11A, cujo tempo de injeção foi somente de 9 segundos, com os eletroferogramas dos dois outros métodos. Nas injeções hidrodinâmicas de 42 (Figura 2.11B) e 120 segundos (Figura 2.11C), respectivamente, o sinal do FEO foi menor e praticamente constante.

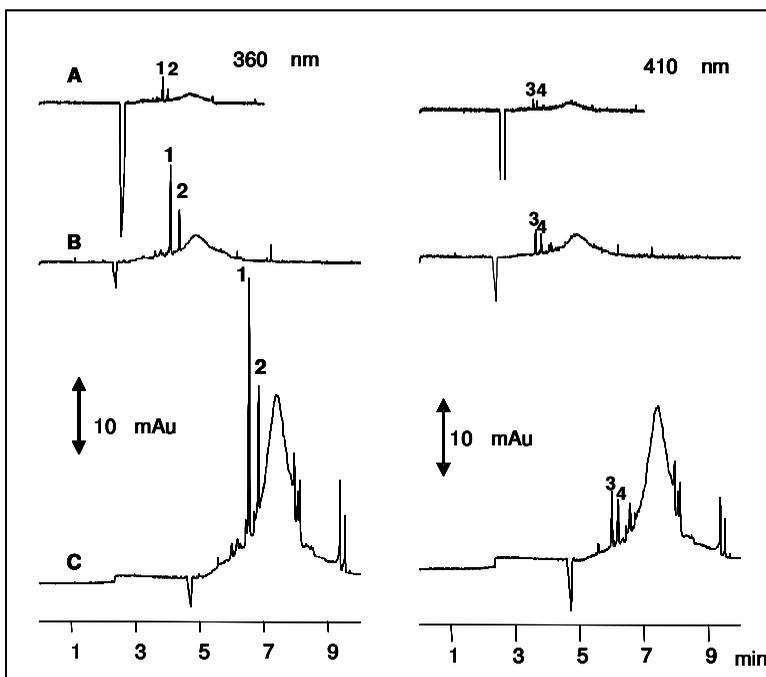


Figura 2.11. Eletroferogramas de uma amostra de uísque autêntico analisado nos três métodos desenvolvidos: (A) NSM, (B) SWMR42, (C) SWMR120, nos comprimentos de onda dos compostos estudados: seringaldeído (1), vanilina (2), sinapaldeído (3) e coniferaldeído (4). Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm; $L_{\text{det}} = 40$ cm; D. I. = $75 \mu\text{m}$); tensão 25kV (polaridade positiva na injeção); temperatura 25°C ; injeção hidrodinâmica 50 mbar A: 9 s, B: 42 s; C: 120 s. Eletrólito: 20 mmol L^{-1} TBS e 10 % MeOH, pH 9,3.

2.3.3 Figuras de mérito

Os valores de R^2 foram maiores que 0,99 para NSM e SWMR42. Os valores para a precisão dos métodos são expressos em termos do desvio padrão relativo (RSD). A repetibilidade foi estabelecida por duas preparações de amostra independentes e injeção em triplicata. As variações para área do pico e tempo de migração foram: NSM 2,1 a 3,3% e 1,2 a 1,8%; SWMR42 3,4 a 4,5% e 2,8 a 3,6 %; SWMR120 4,2 a 5,7% e 4,7 a 5,8%, respectivamente.

A razão sinal/ruído (S/N) de 3 e 10 foram consideradas para estimar o LD e o LQ, respectivamente. Estes valores foram melhores que $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $330 \mu\text{g L}^{-1}$; $22 \mu\text{g L}^{-1}$ e $73 \mu\text{g L}^{-1}$; $9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $30 \mu\text{g L}^{-1}$ para NSM, SWMR42 e SWMR120, respectivamente.

A Tabela 2.1 apresenta algumas figuras de mérito das curvas de calibração externa avaliadas nos métodos NSM e SWMR42. Como as amostras não foram quantificadas pelo método SWMR120, os parâmetros de validação referentes a este método foram omitidos, pois só poderiam ser obtidos pelo método de adição de padrão.

Tabela 2.1. Algumas figuras de mérito dos dois métodos de “stacking” utilizados (NSM e SWMR42), na quantificação das amostras.

NSM					
	a	b	R ²	LD*	LQ*
Seringaldeído	6,937	-2,473	0,9994	100	330
Vanilina	7,886	-1,420	0,9991	30	99
Sinapaldeído	6,166	-1,152	0,9989	40	132
Coniferaldeído	7,7378	-1,370	0,9945	50	165
SWMR42					
	a	b	R ²	LD*	LQ*
Seringaldeído	28,168	0,232	0,9992	22	73
Vanilina	31,228	0,291	0,9980	6	22
Sinapaldeído	24,596	-0,213	0,9987	9	30
Coniferaldeído	30,975	0,136	0,9991	11	37

* concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.3.4 Análise das amostras

Um total de 30 diferentes amostras de uísque foram analisadas, sendo 8 amostras autênticas, 21 amostras apreendidas por suspeita de falsificação e 1 adquirida no comércio local (amostra A3). Todas as amostras foram, inicialmente, analisadas no método NSM, desenvolvido neste estudo. As amostras autênticas e a adquirida no comércio local apresentaram valores de concentrações dos analitos maiores do que o LQ, com exceção da amostra D1, que resultou em um sinal analítico menor do que o LQ para o sinapaldeído.

Das 21 amostras apreendidas, somente quatro tiveram um sinal analítico maior do que o LD, todos para vanilina. Estas quatro amostras

e a amostra autêntica D1 foram analisadas usando o método SWMR42. A Tabela 2.2 apresenta os resultados das amostras analisadas.

As 17 amostras restantes foram analisadas pelo método SWMR120 e apresentaram valores abaixo do LD para as quatro substâncias analisadas.

Embora quatro amostras apreendidas tenham apresentado concentrações de vanilina detectáveis, as mesmas diferiram de suas respectivas amostras autênticas em relação ao perfil eletroforético e, também, na concentração analítica dos outros aldeídos aromáticos, incluindo a vanilina. Isto sugere que estas amostras foram adulteradas, uma vez que elas são amostras de uísques envelhecidos 12 anos, e espera-se que a concentração destes compostos, após este tempo de maturação, seja alta. Comparada às outras amostras de uísques autênticos, a amostra D1 apresentou valores de concentração inferiores para as substâncias estudadas, provavelmente, devido ao pouco tempo de envelhecimento (um ano).

Tabela 2.2. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos aldeídos fenólicos nas amostras de uísque obtidas pelos métodos desenvolvidos utilizando eletroforese capilar.

Amostra	Origem	Maturação	Seringaldeído	Vanilina	Sinapaldeído	Coniferaldeído
A1 ^a	Autêntica	8 anos	1792 ± 39	805 ± 19	354 ± 10	380 ± 12
A2 ^a	Autêntica	8 anos	2171 ± 47	945 ± 23	419 ± 11	401 ± 11
B1 ^a	Autêntica	12 anos	2269 ± 64	1100 ± 34	436 ± 14	394 ± 13
C1 ^a	Autêntica	12 anos	2733 ± 58	1288 ± 38	487 ± 15	465 ± 15
D1 ^a	Autêntica	1 ano	1660 ± 37	651 ± 19	284 ± 8	227 ± 7
E1 ^a	Autêntica	12 anos	4345 ± 143	1997 ± 63	701 ± 22	715 ± 23
F1 ^a	Autêntica	12 anos	4592 ± 147	2249 ± 73	739 ± 23	511 ± 16
F2 ^a	Autêntica	12 anos	3386 ± 112	1596 ± 47	383 ± 11	481 ± 13
G1 ^a	Autêntica	12 anos	2979 ± 91	1413 ± 44	529 ± 18	463 ± 14
H1 ^a	Autêntica	desconhecido	22055 ± 551	6996 ± 178	9068 ± 268	8775 ± 255
A3 ^a	Comprada	8 anos	1986 ± 58	795 ± 23	508 ± 16	374 ± 12
G2 ^b	Suspeita	12 anos	<LOD	269 ± 12	<LOD	<LOD
C2 ^b	Suspeita	12 anos	<LOD	280 ± 13	<LOD	<LOD
B2 ^b	Suspeita	12 anos	<LOD	271 ± 11	<LOD	<LOD
H2 ^b	Suspeita	desconhecido	<LOD	367 ± 16	<LOD	<LOD
F3 ^b	Suspeita	12 anos	<LOD	450 ± 15	<LOD	<LOD
D1 ^b	Autêntica	1 ano	1984 ± 71	802 ± 24	124 ± 5	166 ± 7

a: quantificadas pelo método NSM.

b: quantificadas pelo método SWMR42.

2.4 Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram o potencial da eletroforese capilar para a identificação de amostras falsas de uísque, através da comparação dos aldeídos fenólicos identificados em amostras de uísques autênticos.

A injeção das amostras pela extremidade mais próxima (“outlet”) ao detector mostrou a possibilidade de diferenciação de amostras de uísque suspeitas de adulteração das amostras autênticas. Porém, como a relação sinal/ruído do coniferaldeído e do sinapaldeído foi inferior a dez, a quantificação nas amostras se tornou impossibilitada. A fim de melhorar a detectabilidade do método, optou-se então pela injeção das amostras e dos padrões pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”), aumentando assim o L_{det} .

O procedimento de “stacking” com remoção de matriz mostrou ser uma ferramenta poderosa no ganho de detectabilidade do método, através dos compostos fenólicos analisados. Usando SWMR, a detectabilidade foi aumentada em cerca de 10 vezes em relação ao modo de “stacking” NSM para as quatro substâncias utilizadas neste estudo. Entretanto, o uso de tempos de injeção longos acarreta em efeitos de matriz e a calibração deve ser feita pelo uso de adição de padrão. O novo método pode ser utilizado para o estudo de aldeídos fenólicos em amostras de uísque. A determinação destes compostos em amostras de uísque pode ser empregada para o estudo dos processos envolvidos na produção de uísque, para verificar a qualidade e a autenticidade da bebida. Novos estudos devem ser realizados para verificar a relação entre o teor de aldeídos fenólicos e o tempo de envelhecimento da bebida.

2.5 Referências bibliográficas

- [1] BEEK, S. van; PRIEST, F. G. Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: a Polyphasic Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 297-305, 2002.
- [2] BALDWIN, S.; BLACK, R. A.; ANDREASEN, A. A.; ADAMS, S. L. Aromatic Congener Formation in Maturation of Alcoholic Distillates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, p. 381-385, 1967.
- [3] LEE, K. Y. M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R.; RICHARDSON, G. D. Sensory discrimination of blended Scotch whiskies of different

product categories. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 109-117, 2001.

[4] MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverage. **Food Science & Technology**, v. 9, p. 95-101, 1998.

[5] CONNER, J. M.; PATERSON, A.; PIGGOT, J. R. Analysis of lignin from oak cask used for the maturation of scotch whisky. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, p. 477-482, 1992.

[6] NG, L.-K.; LAFONTAINE, P.; HARNOIS, J. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages: Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 29-38, 2000.

[7] CONNER, J. M.; PATERSON, A.; PIGGOT, J. R. Changes in wood extractives from oak cask staves through maturation of scotch malt whisky. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 169-174, 1993.

[8] RAGNAR, M.; LINDGREN, C. T.; NILVEBRANT, N. –O. pKa-values of Guaiacyl and Syringyl Phenols Related to Lignin. **J. Wood Chem. Technol.** v. 20, p. 277–305, 2000.

[9] FRANCIS, I. L.; SEFTON, M. A.; WILLIAMS, P. J. A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning and heating on the aromas of oak model wine extracts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, p. 23-30, 1992.

[10] CALDEIRA, M.; RODRIGUES, F.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CAMARA, J. S. Comparison of two extraction methods for evaluation of volatile constituents patterns in commercial whiskeys. Elucidation of the main odour-active compounds. **Talanta**, v. 74, p. 78-90, 2007.

[11] PONTES, M. J. C.; SANTOS, S. R. B.; ARAÚJO, M. C. U.; ALMEIDA, L. F.; LIMA, R. A. C.; GAIÃO, E. N.; SOUTO, U. T. C. P. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. **Food Research International**, v. 39, p. 182-186, 2006.

Capítulo III

Análise de frutose, glicose e sacarose em amostras de uísque utilizando eletroforese capilar

3.1 Introdução

Os carboidratos estão entre os compostos mais abundantes encontrados na natureza, tendo um papel importante do ponto de vista nutricional, uma vez que são fontes de energia e vitalidade [1,2]. No entanto, os açúcares são comumente utilizados como aditivos alimentares [3].

A análise de açúcares é muito importante para a indústria alimentícia, pois eles contribuem para as propriedades organolépticas e para o paladar dos alimentos e bebidas [1].

Em se tratando da fabricação de bebidas envelhecidas em barris de madeira, a presença de monossacarídeos como frutose e glicose, pode estar relacionada ao tipo de madeira utilizada na confecção dos barris [4,5].

O uísque, assim como o conhaque e o vinho, é tradicionalmente envelhecido em barris de carvalho. Durante a sua maturação muitos compostos fenólicos são incorporados à bebida modificando suas propriedades organolépticas, como a cor, que com o passar dos anos se torna bastante intensa [6-9].

Com o intuito de imitar a coloração castanho escuro dos uísques envelhecidos, os falsificadores de bebidas comumente adicionam corante caramelo às suas adulterações [10]. Assim sendo, o monitoramento do teor de açúcares é um importante parâmetro no controle de qualidade de alimentos e bebidas, pois através da sua análise é possível avaliar o grau de maturidade, a autenticidade e uma possível modificação microbiológica dos produtos durante o seu armazenamento [11].

Várias técnicas de análise de açúcares já foram desenvolvidas, entre elas podem ser citadas a espectroscopia de infra-vermelho [12], a cromatografia a gás [13], a cromatografia de troca iônica [14]; mas, uma vez que, os açúcares são compostos não-voláteis, a técnica de análise comumente utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores de índice de refração [15], de arranjo de diodos [16] e amperométricos [17]. A eletroforese capilar também é utilizada na análise de açúcares e entre os métodos desenvolvidos a partir desta técnica, se pode citar o trabalho de Liping He e colaboradores que realizaram a separação de sacarídeos derivatizados com ácido 2-aminobenzóico por EC e compararam as suas estruturas por ressonância magnética nuclear [18].

Devem ser considerados dois fatores antes do desenvolvimento de um método eletroforético para determinação de açúcares: 1) com a exceção de alguns mono e oligossacarídeos que são naturalmente carre-

gados, a maioria dos carboidratos não é facilmente ionizável, o que impede a sua migração e, conseqüente, separação em eletroforese em valores baixos de pH; 2) a maioria das espécies de carboidratos apresenta baixa absorvidade molar na região do UV/Vis, uma característica que impede a sua sensível detecção por técnicas analíticas que utilizam este tipo de detector [3,19,20].

Entre as metodologias relacionadas à análise de carboidratos, várias utilizam derivatização das amostras antes da análise [18, 21-23]. Embora estes métodos melhorem a detectabilidade, a complexidade da derivatização limita o seu uso.

Como alternativa, métodos para a determinação de açúcares sem derivatização foram desenvolvidos. Estes métodos incluem o uso de eletrólitos em meio fortemente básico para ionizar os carboidratos e torná-los adequados para a detecção UV indireta, por exemplo, Soga e colaboradores utilizaram como eletrólito de corrida ácido 2,6-piridinodicarboxílico (como cromóforo) com brometo de cetiltrimetilamônio (como inversor do FEO), em pH 12,1 (ajustado com hidróxido de sódio) em duas análises: a primeira, na determinação de carboidratos em alimentos [19] e a segunda, na determinação de monossacarídeos em glicoproteínas [24]. Em outro trabalho, Zeman *et al.* separou e quantificou açúcares em refrigerantes, utilizando sorbato de potássio, brometo de hexadimetrina, em pH 12,1, também ajustado com hidróxido de sódio [25].

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método rápido e eficiente para a determinação de açúcares, sem a necessidade de derivatização, a fim de diferenciar amostras de uísques autênticos de amostras apreendidas por suspeita de serem falsificadas.

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE™ MDQ da marca Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos ajustado em 254 nm (detecção indireta).

As medidas foram feitas a 30 °C em um capilar de sílica fundida (40 cm × 50 µm D. I. × 375 µm D. E.) adquirido da Polymicro (Phoenix, AZ, E.U.A.). O capilar foi condicionado com o eletrólito de corrida durante 1 minuto entre as análises.

As soluções padrão e as amostras foram introduzidas pela extremidade mais afastada do detector (“inlet”) e injetadas hidrodinamicamente sob pressão de 0,5 psi.

A tensão de separação aplicada foi 30 kV, com polaridade negativa. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o programa Karat.

3.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico. Hidróxido de sódio e o padrão de glicose foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido sórbico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e os padrões de frutose e sacarose foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

Água desionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) foi utilizada no preparo das soluções. Uma solução padrão estoque (10 mg L^{-1}) dos açúcares foi preparada em água desionizada para construção das curvas de calibração.

3.2.3 Amostras

3.2.3.1 Aquisição das amostras

Das 30 amostras analisadas, 29 foram gentilmente cedidas pela Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo e uma foi adquirida no comércio local. Porém, como esta etapa do estudo foi realizada um ano após a aquisição das 30 amostras iniciais, somente 27 se apresentava em condições de análise, pois as outras 03 encontravam-se visualmente degradadas.

3.2.3.2 Preparo das amostras

As amostras de uísque autênticas foram injetadas diretamente no equipamento de EC. Enquanto que as amostras suspeitas de adulteração foram diluídas com água, conforme a necessidade, antes da injeção.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Composição do eletrólito de corrida

A determinação de carboidratos não-derivatizados em pH moderado é difícil de ser realizada, pois nestas condições estes não possuem mobilidade eletroforética suficientemente elevada para a sepa-

possuem mobilidade eletroforética suficientemente elevada para a separação. Uma vez que o pK_a dos açúcares varia entre 12,03 e 12,51 [24], foi necessário um meio fortemente básico para que os analitos ficassem ionizados negativamente. Então, escolheu-se hidróxido de sódio como um dos componentes do eletrólito e as concentrações avaliadas foram de 25 a 45 mmol L⁻¹. A concentração que garantiu tempos de análise mais curtos (em torno de 4 min) e picos com maior eficiência foi a de 35 mmol L⁻¹, pH 12,62. Neste pH, a mobilidade eletroforética e, como consequência, a velocidade de separação mostraram-se elevadas.

A fim de minimizar a característica de baixa detectabilidade do método a detecção dos analitos de interesse foi realizada no modo indireto, pela escolha de um co-íon cromóforo adequado para a composição do eletrólito, ácido sórbico na concentração de 10 mmol L⁻¹. Este composto satisfaz condições importantes, como o fato de sua mobilidade ser bem próxima a dos analitos e possuir um coeficiente de absorvidade molar elevado no comprimento de onda de 254 nm, valor amplamente encontrado em detectores espectrofotométricos de comprimento de onda único. Outra vantagem apresentada pelo sorbato é o fato de possuir apenas uma carga negativa. Isto permite que a razão de transferência seja de 1:1, ou seja, uma molécula do analito desloca uma molécula do eletrólito de corrida, garantindo a detecção dos açúcares com uma sensibilidade analítica satisfatória.

No pH de trabalho a mobilidade do fluxo normal é muito alta e a diferença de mobilidade dos analitos é pequena o que implica numa baixa resolução quando esse modo de operação é utilizado. Uma alternativa é a utilização do fluxo eletrosmótico invertido. Como o fluxo invertido tem uma mobilidade menor que o fluxo normal uma melhor separação é alcançada, assim optou-se por utilizar o modo de operação co-eletrosmótico. Na separação de analitos aniônicos pelo modo co-eletrosmótico deve-se considerar um requisito importante, a inversão do fluxo eletrosmótico, obtida pela inversão da polaridade de separação, assim como, com o uso de sais quaternários de amônio, como brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Estes surfactantes invertem o fluxo eletrosmótico através da formação de uma camada carregada positivamente junto à parede do capilar, enquanto que o seio da solução fica carregado negativamente. Neste trabalho, optou-se pelo CTAB para reverter o fluxo eletrosmótico e ele foi adicionado ao eletrólito de corrida na concentração final de 0,125 mmol L⁻¹.

3.3.2 Parâmetros instrumentais

O desenvolvimento do método foi realizado através de um planejamento fatorial de dois níveis e três variáveis. As variáveis estudadas foram os parâmetros instrumentais de temperatura do cartucho, tempo de injeção e voltagem de separação, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Variáveis analisadas no planejamento dos experimentos.

Variável	Nível (-)	Nível (+)
Tempo de injeção (s)	3	7
Temperatura do cartucho (° C)	20	30
Voltagem (kV)	20	30

Para determinar qual a melhor combinação das variáveis, montou-se uma expressão como resposta (Equação 3.1), observando-se a eficiência (N) dos picos e o tempo de migração (t_m) dos analitos.

$$Resposta = \frac{N}{t_m} \quad (3.1)$$

A eficiência foi mensurada pelo número de pratos (Equação 3.2), onde w_b representa a largura dos picos.

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (3.2)$$

Após a análise dos oito ensaios gerados pelas combinações das variáveis nos dois níveis, concluiu-se que a melhor condição era a combinação gerada pelo sexto ensaio: tempo de injeção de 3 s, temperatura 30 °C e voltagem de 30 kV, pois estas condições resultaram na melhor resposta, como apresenta a Tabela 3.2. Além disso, comparando-se os eletroferogramas dos experimentos, qualitativamente, estas condições também seriam escolhidas, uma vez que, elas promoveram o eletroferograma melhor resolvido num menor tempo de análise.

Tabela 3.2. Resultados de N para os ensaios realizados e a respectiva resposta para cada analito.

Frutose			Glicose			Sacarose		
N	t_m	Resposta	N	t_m	Resposta	N	t_m	Resposta
34472.11	5.57	6188.89	14256.36	5.97	2388.00	40343.59	7.03	5738.78
28714.84	4.66	6161.98	17635.84	4.98	3541.33	20808.06	5.77	3606.25
16256.25	5.10	3187.50	8885.11	5.42	1639.32	17147.21	6.22	2756.79
10572.68	4.37	2419.38	10631.90	4.64	2291.36	11025.00	5.25	2100.00
1049.13	3.32	316.00	7788.06	3.53	2206.25	32080.79	4.03	7960.49
15597.23	2.81	5550.62	14304.16	2.99	4784.00	28392.25	3.37	8425.00
12618.78	3.37	3744.44	7056.00	3.57	1976.47	6593.44	4.06	1624.00
9152.11	2.87	3188.89	7544.16	3.04	2481.63	5776.00	3.42	1688.89

3.3.3 Condições analíticas do método

O co-íon cromóforo escolhido para a detecção indireta dos carboidratos foi o sorbato, cuja absorvidade máxima é observada em 254 nm [24], valor que mostrou uma sensibilidade adequada no que diz respeito à área e a altura do pico e, também, à razão sinal-ruído, como mostra o eletroferograma de uma mistura padrão (300 mg L⁻¹) dos açúcares frutose, glicose e sacarose, (Figura 3.1).

As três curvas de calibração mostraram boa linearidade na faixa de 50 a 500 mg L⁻¹. Os pontos da curva de calibração, assim como as amostras foram repetidos duas vezes. As curvas de calibração indicaram boa correlação entre a área dos picos e a concentração dos açúcares e os coeficientes de determinação foram superiores a 0,9910 para os três analitos, (Tabela 3.3).

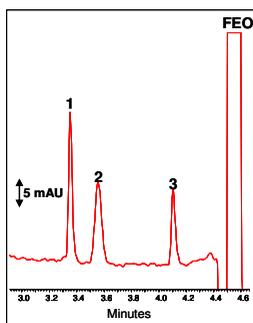


Figura 3.1. Eletroferograma de uma mistura padrão consistindo de frutose (1), glicose (2) e sacarose (3). Condições experimentais: capilar de sílica fundida ($L_{\text{tot}} = 40$ cm; $L_{\text{det}} = 30$ cm; D. I. = 50 μm); tensão 30 kV (polaridade negativa); temperatura 30 °C; injeção hidrodinâmica 0,5 psi/3 s. Eletrólito: 35 mmol L⁻¹ NaOH, 10 mmol L⁻¹ ácido sórbico e 0,125 mmol L⁻¹ CTAB, pH 12,62.

A ordem de migração dos açúcares está de acordo com os seus valores de pK_a , com o dissacarídeo exibindo uma mobilidade eletroforética menor que os monossacarídeos.

Tabela 3.3. Características analíticas do método de determinação de açúcares. Condições experimentais, conforme descrito na Figura 3.1.

Analito	R ²	LD*	LQ*
Frutose	0,9986	25,85	86,17
Glicose	0,9910	68,42	228,06
Sacarose	0,9934	53,84	179,47

*mg L⁻¹

3.3.4 Análise das amostras

Com o método desenvolvido, partiu-se para a determinação quantitativa dos açúcares nas amostras de uísques, com o objetivo de distinguir uísques falsos de autênticos.

Como citado anteriormente, neste trabalho as amostras não foram derivatizadas e não passaram por nenhum pré-tratamento, a não ser algumas amostras suspeitas de uísques 12 anos que necessitaram ser diluídas dez vezes antes da injeção.

A Figura 3.2 compara o eletroferograma de um uísque autêntico envelhecido 12 anos (Figura 3.2 B) com o eletroferograma gerado por uma amostra de uísque 12 anos suspeita (Figura 3.2 A). Na figura, percebe-se claramente uma diferença qualitativa entre as amostras devido à presença do pico de sacarose (3) na amostra suspeita. Esse perfil foi apresentado por todas as amostras de uísques 12 anos apreendidas e por uma amostra de uísque 8 anos adquirida no comércio local.

Os dados apresentados na Tabela 3.4 mostram que tanto nos uísques 8 anos autênticos quanto nas respectivas amostras suspeitas, a sacarose se encontra abaixo do limite de detecção do método. No entanto, nos uísques 12 anos suspeitos a quantidade encontrada deste açúcar é muito superior. Estes dados levam a crer que estas amostras suspeitas são realmente fruto de falsificações, pois é notório que uísques envelhecidos 12 anos possuem uma forte cor castanha escuro, o que corrobora a informação de que os fraudadores adicionam corante caramelo as suas adulterações.

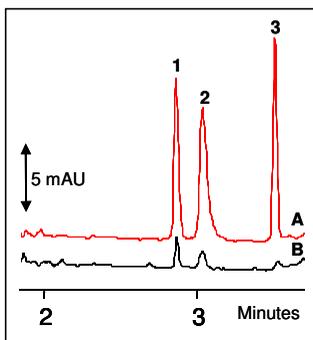


Figura 3.2. Eletroferogramas da análise de açúcares em amostras de uísques 12 anos. A: uísque apreendido por suspeita de falsificação. B: uísque autêntico. Identificação dos picos: frutose (1), glicose (2) e sacarose (3). Condições experimentais, conforme descrito na Figura 3.1.

Tabela 3.4. Faixa de concentração (mg L^{-1}) de sacarose, obtida pelo método proposto por eletroforese capilar. Condições experimentais, conforme descrito na Figura 3.1.

Amostra	Concentração	Origem	Maturação
C2	$5976,28 \pm 267,82$	Suspeita	12 anos
G2	$5128,28 \pm 370,62$	Suspeita	12 anos
B2	$1796,10 \pm 87,41$	Suspeita	12 anos
F3	$3219,16 \pm 280,41$	Suspeita	12 anos
H2	$3670,11 \pm 481,80$	Suspeita	desconhecido
A3	$127,49 \pm 7,76$	Comprada	8 anos
F4	< LD	Suspeita	8 anos
F5	< LD	Suspeita	8 anos
C1	< LD	Autêntica	12 anos
G1	< LD	Autêntica	12 anos
B1	< LD	Autêntica	12 anos
A1	< LD	Autêntica	8 anos
A2	< LD	Autêntica	8 anos
F1	< LD	Autêntica	12 anos
F2	< LD	Autêntica	12 anos
B3	< LD	Suspeita	12 anos
A4	< LD	Suspeita	8 ano
A5	< LD	Suspeita	8 ano
A6	< LD	Suspeita	8 ano
A7	< LD	Suspeita	8 ano
R1	< LD	Suspeita	1 ano
J1	< LD	Suspeita	8 anos
L1	< LD	Suspeita	8 anos
E1	< LD	Suspeita	12 anos
E2	< LD	Suspeita	12 anos
N1	< LD	Suspeita	1 ano
N2	< LD	Suspeita	1 ano

A Figura 3.3 apresenta um gráfico expondo o teor de frutose e glicose encontrado nas amostras de uísques 8 anos. Nela é possível observar que tanto as amostras autênticas quanto as suspeitas apresentaram certa quantidade dos dois analitos. Sendo assim, por estes dados não se pode diferenciar um uísques autêntico de um falsificado, uma vez que é normal se detectar estes açúcares em bebidas que passam por etapas de

fermentação e envelhecimento em barris de madeira durante o processo de fabricação.

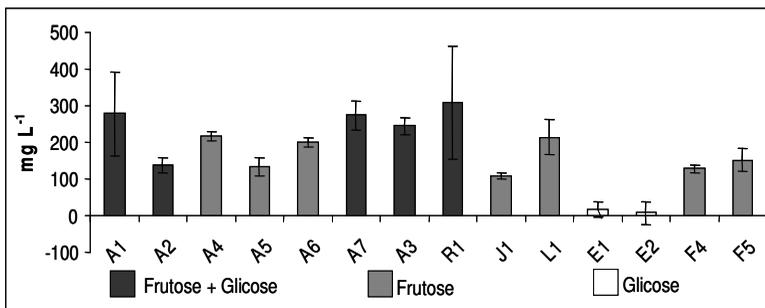


Figura 3.3. Gráfico da concentração de frutose e glicose *versus* amostras de uísques 8 anos autênticas e suspeitas. Condições experimentais, conforme descrito na Figura 3.1.

O resultado da análise das amostras de uísques 12 anos se mostrou diferente daquele obtido para as amostras envelhecidas 8 anos, em relação à frutose e a glicose. Como pode ser observado na Figura 3.4, as amostras autênticas apresentam as concentrações destes açúcares praticamente no mesmo nível encontrado nos uísques 8 anos. Porém, as amostras suspeitas possuem os analitos em concentrações muito mais elevadas, o que pode ser um indicativo de falsificação através da adição de sacarose, que por sua vez sofre hidrólise, liberando frutose e glicose na bebida.

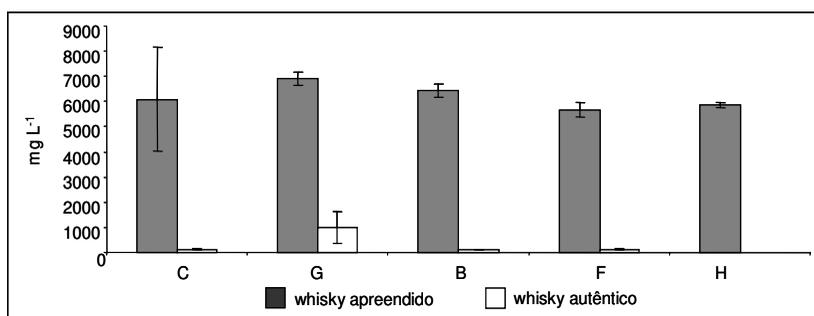


Figura 3.4. Gráfico da concentração de açúcar total (frutose + glicose) *versus* amostras de uísques 12 anos autênticas e suspeitas. Condições experimentais, conforme descrito na Figura 3.1.

3.4 Conclusão

O método desenvolvido por eletroforese capilar no modo coeletrosmótico demonstrou ser rápido e eficiente para a análise de mono e dissacarídeos não-derivatizados, com um mínimo preparo de amostra, apenas diluição, quando necessário. A análise quantitativa dos três açúcares foi realizada em um tempo de análise total inferior a 5 min. No entanto, somente esta análise não garante a diferenciação de uísques autênticos de amostras suspeitas; porém, o método pode ser utilizado para atestar a autenticidade de uísques envelhecidos 12 anos no que se refere à presença de sacarose.

3.5 Referências bibliográficas

[1] GOMIS, D. B.; TAMAYO, D. M.; ALONSO, J. M. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 436, p. 173–180, 2001.

[2] BRUGGINK, C.; MAURER, R.; HERRMANN, H.; CAVALLI, S.; HOEFLER, F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 104–109, 2005.

[3] PAULUS, A.; KLOCKOW, A. Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 3537–376, 1996.

[4] VIRIOT, C.; SCALBERT, A.; LAPIERRE, C.; MOUTOUNET, M. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1872-1879, 1993.

[5] ALAMO M. del; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J. del; GOMÉZ-CORDOVÉS, C. Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. **Food Chemistry**, v. 71, p. 189-193, 2000.

[6] BEEK, S. van; PRIEST, F. G. Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: a Polyphasic Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 297-305, 2002.

- [7] BALDWIN, S.; BLACK, R. A.; ANDREASEN, A. A.; ADAMS, S. L. Aromatic Congener Formation in Maturation of Alcoholic Distillates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, p. 381-385, 1967.
- [8] LEE, K. Y. M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R.; RICHARDSON, G. D. Sensory discrimination of blended Scotch whiskies of different product categories. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 109-117, 2001.
- [9] MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverage. **Food Science & Technology**, v. 9, p. 95-101, 1998.
- [10] NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BAR-SOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 39-42, 2001.
- [11] DONG, S.; ZHANG, S.; CHENG, X.; HE, P.; WANG, Q.; FANG, Y. Simultaneous determination of sugars and ascorbic acid by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a carbon paste electrode modified with polyethylene glycol and Cu₂O. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 327-333, 2007.
- [12] KULIGOWSKI, J.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. de la. On-line gradient liquid chromatography-Fourier transform infrared spectrometry determination of sugars in beverages using chemometric background correction. **Talanta**, v. 77, p. 779-785, 2008.
- [13] CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. **Food Chemistry**, v. 112, p. 747-755, 2009.
- [14] CASELLA, I. G.; GATTA, M. Determination of electroactive organic acids by anion-exchange chromatography using a copper modified electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 223-233, 2001.
- [15] VÉRETTE, E.; QIAN, F.; MANGANI, F. On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugar and organic acids in food and beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 705, p. 195-203, 1995.

- [16] KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 187–192, 2009.
- [17] CATALDI, T. R. I.; MARGIOTTA, G.; ZAMBONIN, C. G. Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. **Food Chemistry**, v. 62, p. 109-115, 1998.
- [18] HE, L.; SATO, K.; ABO, M.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Separation of saccharides derivatized with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis and their structural consideration by nuclear magnetic resonance. **Analytical Biochemistry**, v. 314, p. 128–134, 2003.
- [19] SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 69, p. 339-344, 2000.
- [20] EL RASSI, Z.; MECHREF, Y. Recent advances in capillary electrophoresis of Carbohydrates. **Electrophoresis**, v. 17, p. 275-301, 1996.
- [21] GUTTMAN, A. Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 763, p. 271-277, 1997.
- [22] HONDA, S.; IWASE, S.; MAKINO, A.; FUJIWARA, S. Simultaneous determination of reducing monosaccharides by capillary zone electrophoresis as the borate complexes of N-2-pyridyl-glycamines. **Analytical Biochemistry**, v. 176, p. 72-77, 1989.
- [23] CORTACERO-RAMÍREZ, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; de CASTRO, M. H-B.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection. **Food Chemistry**, v. 87, p. 471–476, 2004.

[24] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 261, p. 73-78, 1998.

[25] ZEMANN, A.; NGUYEN, D. T.; BONN, G. Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1142-1147, 1997.

Capítulo IV

Verificação da autenticidade de amostras de uísque através da determinação dos ácidos acético, fórmico, láctico e glicólico utilizando eletroforese capilar

4.1 Introdução

A análise de ácidos orgânicos em bebidas alcoólicas é de suma importância no controle de qualidade destes produtos, pois esta classe de compostos químicos é uma das responsáveis pela obtenção das propriedades organolépticas que a bebida adquire durante o seu processo de fabricação [1-3].

O uísque, assim como outras bebidas, passa pelo estágio de fermentação durante a sua fabricação e neste período ácidos como succínico, láctico e acético são formados [4]. O monitoramento destes compostos permite acompanhar se a bebida foi manufaturada adequadamente e, também, possibilita o controle de bebidas suspeitas de adulteração ou falsificação [4].

Os métodos cromatográficos, tais como cromatografia gasosa (CG) [5,6], cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [7] e cromatografia de troca iônica [8], normalmente, são os mais utilizados na análise destas substâncias. Embora estes métodos mostrem-se precisos e eficazes, eles possuem algumas características não muito desejáveis, tais como o uso de grandes quantidades de eluentes e a necessidade de pré-tratamento das amostras, como a derivatização, que aumentam o tempo total de análise [9].

Atualmente, a eletroforese capilar (CE) tem se mostrado uma alternativa atraente como ferramenta analítica, tendo em vista a alta eficiência na separação, o baixo custo de análise, rapidez na aquisição e tratamento dos dados sem a necessidade de pré-tratamento das amostras com pouca geração de resíduos [9].

Embora o uso de métodos eletroforéticos com detecção direta [10,11] seja utilizado na análise de ácidos alifáticos, estes métodos não são os mais empregados, tendo em vista que nem todos os equipamentos disponíveis no mercado possuem detectores que absorvem na região inferior a 200 nm [12]. Sendo assim, o mais comum é analisá-los pelo modo indireto [13,14].

Porém, neste tipo de análise, um cuidado especial é necessário na escolha dos constituintes do eletrólito, pois ele deverá conter um co-íon cromóforo que absorva na região do UV. Estes ácidos, geralmente, migram como ânions, mas para que sejam analisados no modo co-eletrosmótico é preciso adicionar um inversor do fluxo eletrosmótico ao eletrólito, logo este componente também deve ser escolhido cuidadosamente [15]. Alguns pesquisadores já desenvolveram métodos eletroforéticos usando a combinação de sais quaternários de amônio e substâncias cromóforas para análise de ácidos alifáticos, entre eles Peres *et al.* [12].

Sendo assim, este estudo propõe um método rápido e eficiente para a identificação e quantificação de ácidos orgânicos alifáticos em amostras de uísque através da utilização de “softwares” como Simul e Peakmaster que constroem curvas de mobilidade em função do pH e simulam a melhor composição do eletrólito de corrida, entre outros parâmetros analíticos, respectivamente. Em outra etapa, propõe o agrupamento dos dados obtidos, através de tratamentos estatísticos, visando a diferenciação das amostras autênticas das apreendidas, pois com base em resultados de análise estatística, pode-se conseguir correlacionar semelhanças e diferenças existentes entre bebidas, no que se refere à misturas, origem, processos de fabricação, entre outros parâmetros [16,17].

Existe uma diversidade de métodos estatísticos incluindo análise univariada e multivariada, bem como modelos não-lineares que são muito úteis para explorar estes dados [16,17].

Entre os métodos de análise multivariada, tais como análise de agrupamento, análise linear discriminante e análise de componentes principais (PCA), este último foi o escolhido para o escopo deste trabalho. O PCA é um método de reconhecimento de padrões que reduz a dimensionalidade da matriz original dos dados, mantendo a máxima quantidade de variáveis, assim como o reconhecimento da estrutura dos dados [16,17].

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE™ MDQ da marca Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos ajustado em 254 nm (detecção indireta).

As medidas foram feitas a 30 °C em um capilar de sílica fundida (60 cm × 50 µm D. I. × 375 µm D. E.) adquirido da Polymicro (Phoenix, AZ, USA). O capilar foi lavado com o eletrólito de corrida por 1 min entre as análises.

As soluções padrão e as amostras foram introduzidas pela extremidade mais afastada do detector (*inlet*) e injetadas hidrodinamicamente sob a pressão de 0,5 psi.

A voltagem para a separação aplicada foi 20 kV, com polaridade negativa no lado da injeção.

A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o programa Karat.

4.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico. Ácido 3,5-dinitrobenzóico (DNB) e o padrão de formiato de sódio foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil), trishidroximetilaminometano (TRIS) foi adquirido da Fluka (São Paulo, Brasil). Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e os padrões dos ácidos láctico e glicólico foram obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O padrão de acetato de sódio foi adquirido da Carlo Erba (São Paulo, Brasil). Água deionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada no preparo das soluções. Uma solução padrão estoque de cada ácido (20 mmol L^{-1}) foi utilizada na identificação dos compostos nas amostras de uísque e na construção das curvas de calibração.

4.2.3 Amostras

Das 30 amostras analisadas, 29 foram gentilmente cedidas pela Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo e uma foi adquirida no comércio local. As amostras de uísque foram diluídas duas vezes com água deionizada antes da injeção no equipamento de EC.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação dos analitos

Os ácidos orgânicos são conhecidos por serem indicadores importantes de uma grande variedade de processos de fermentações, contribuindo assim, para o sabor e a estabilidade física de bebidas alcoólicas, como os vinhos [18].

Na literatura, tem-se reportado várias metodologias analíticas para identificação e quantificação de ácidos alifáticos em bebidas alcoólicas. A Tabela 1 apresenta uma revisão dos analitos em questão analisados por vários métodos de separação.

Tabela 4.1. Determinação de ácidos alifáticos em bebidas por diversas técnicas analíticas.

Ácidos	Bebida	Técnica de Separação	Referência
Acético	vinho do Porto branco/tinto, vinho tinto/branco	CZE com detecção indireta, CZE com detecção direta	[3], [11], [12], [14]
Butírico	vinho tinto/branco	CZE com detecção direta	[21]
Cítrico	cerveja, uísque, cognac, vinho tinto/branco	HPLC, CG-MS, CZE com detecção direta	[6], [11], [14], [19]
Fórmico	brandy, vinho tinto/branco	Isotacoforese Capilar, CZE com detecção direta	[16], [21]
Fumárico	cerveja, uísque, cognac, vinho tinto/branco	CZE com detecção direta, CG-MS	[6], [11], [20]
Glutárico	uísque, cognac	CG-MS	[6]
Glicólico	uísque, cognac	CG-MS	[6]
Glutâmico	uísque, cognac	CG-MS	[6]
Láctico	cerveja, uísque, cognac, vinho tinto/branco, vinho do Porto branco/tinto	HPLC, CG-MS, CZE com detecção indireta, CZE com detecção direta	[3], [6], [11], [12], [14],
Malêico	brandy, vinho tinto/branco	Isotacoforese Capilar, CZE com detecção direta	[16], [21]
Málico	cerveja, uísque, cognac, vinho tinto/branco vinho do Porto branco/tinto	HPLC, CG-MS, CZE com detecção indireta, CZE com detecção direta	[3], [6], [11], [12], [14],
Malônico	Brandy	Isotacoforese Capilar	[16]
Oxálico	cerveja, vinho tinto/branco	HPLC, CG-MS, CZE com detecção direta	[3], [6], [12], [19]
Pirúvico	uísque, cognac	CG-MS	[6]
Succínico	uísque, cognac, vinho tinto/branco vinho do Porto branco/tinto	CG-MS, CZE com detecção indireta	[3], [6], [12], [14]
Tartárico	uísque, cognac, vinho tinto/branco vinho do Porto branco/tinto	CG-MS, CZE com detecção indireta	[3], [6], [12], [14]

4.3.2 Desenvolvimento do eletrólito de corrida

Estes ácidos apresentam valores de pK_a similares entre si, assim, dependendo do pH do meio em que se encontram, eles podem estar completamente ou parcialmente ionizados, podendo ser detectados como ânions.

Para a elaboração de um eletrólito de corrida adequado para a separação dos dezesseis ácidos alifáticos listados, foram construídas curvas de mobilidade efetiva em função do pH para cada um deles (Figura 4.1), através de dados de mobilidade iônica e pK_a obtidos da literatura [22].

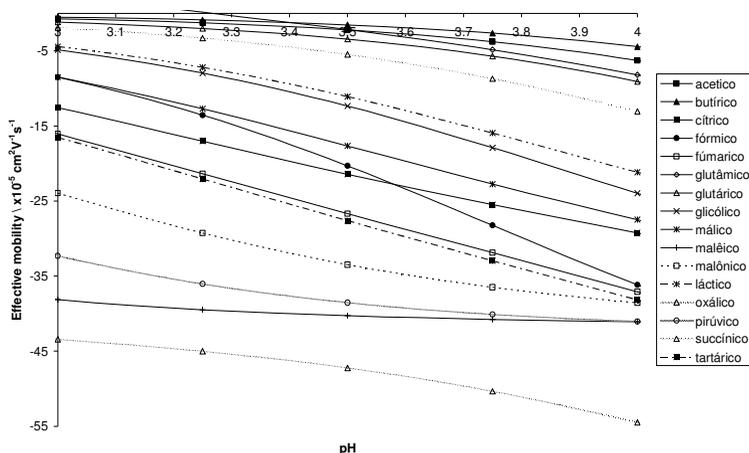


Figura 4.1. Curvas de mobilidade *versus* pH.

Na Figura 4.1 mostra-se a faixa de pH (3 a 4) mais indicada para obter uma separação efetiva dos ácidos, escolhida tendo em vista problemas de co-migração entre alguns deles em valores inferiores e superiores a esta faixa. Porém, neste intervalo as mobilidades dos analitos são relativamente baixas.

Sendo assim, optou-se por analisá-los no modo co-eletrosmótico para que a mobilidade dos analitos e do fluxo eletrosmótico fossem somadas e, assim, diminuísse o tempo total de análise. Na separação de analitos aniônicos pelo modo co-eletrosmótico deve-se considerar um requisito importante, a inversão do fluxo eletrosmótico, obtida com o uso de sais quaternários de amônio, por exemplo. Neste trabalho, optou-se pelo CTAB para reverter o fluxo eletrosmótico e ele foi adicionado ao eletrólito de corrida na concentração final de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Uma vez que entre os analitos estudados apenas alguns absorvem radiação UV acima de 200 nm, optou-se por analisá-los via detecção indireta. Nesta etapa da escolha do componente cromóforo do eletrólito, dois fatores devem ser considerados relevantes: a mobilidade e a absorvidade molar do co-íon. Peres *et al.* relataram o uso do ácido 3,5-dinitrobenzóico como co-íon, pois nas condições do eletrólito, a sua mobilidade é bem próxima a dos analitos, o que diminui fenômenos de dispersão por eletromigração, pois picos mais simétricos são obtidos quando as mobilidades do co-íon e dos analitos são bastante similares, também, o fato deste composto possuir um $\lambda_{\text{máx.}}$ em 254 nm garante a detecção indireta dos ânions com uma boa sensibilidade analítica.

Para ajustar o pH do eletrólito de corrida foi escolhida como contra-íon a base trishidroximetilaminometano, pois este composto possui algumas características apreciáveis, como ser um padrão primário, possibilitar que o eletrólito de corrida seja preparado por massa, uma vez que, o ácido 3,5-dinitrobenzóico também é sólido. Desta forma, o eletrólito otimizado, mediante construção de curvas de mobilidade efetiva *versus* pH, foi constituído por 8,5 mmol L⁻¹ de trishidroximetilaminometano, 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 0,2 mmol L⁻¹ de brometo de cetiltrimetilamônio, pH 3,63.

Após o desenvolvimento do eletrólito de corrida, utilizou-se o “software” de simulação Peakmaster para verificar se a separação dos dezesseis ácidos ocorreria efetivamente. A Figura 4.2 mostra um eletroferograma teórico obtido no simulador.

Depois de avaliada a *performance* do método fêz-se um *screening* com as trinta amostras de uísque e pela comparação entre os seus eletroferogramas e o simulado, constatou-se que estas amostras continham apenas os ácidos fórmico, acético, láctico e glicólico, como pode ser observado na Figura 4.3, na qual é apresentado um eletroferograma de uma amostra autêntica de uísque 12 anos.

A identificação dos ácidos foi baseada nos tempos de migração e, posteriormente, confirmada pela adição de padrões analíticos dos mesmos às amostras. Porém, estes experimentos foram realizados somente após o uso do simulador, o que mostra uma vantagem na utilização destes “softwares”, pois eles permitem visualizar e otimizar diversos tipos de separações sem o uso de amostras, reagentes e padrões e, também, sem desperdício de tempo por parte do analista.

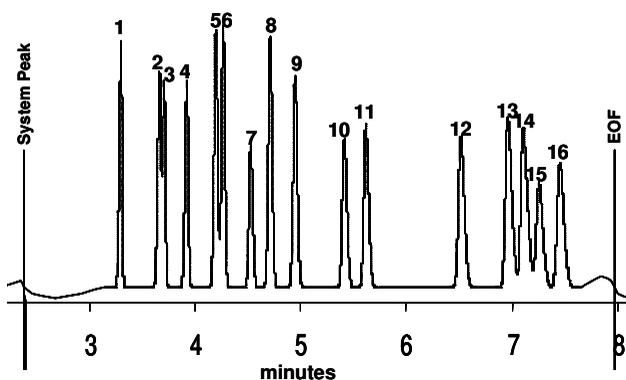


Figura 4.2. Eletroferograma simulado dos ácidos alifáticos identificados em bebidas alcoólicas, nas condições otimizadas. Ácidos: 1) oxálico, 2) malêico, 3) pirúvico, 4) malônico, 5) tartárico, 6) fumárico, 7) fórmico, 8) cítrico, 9) málico, 10) glicólico, 11) láctico, 12) succínico, 13) glutárico, 14) glutâmico, 15) acético, 16) butírico.

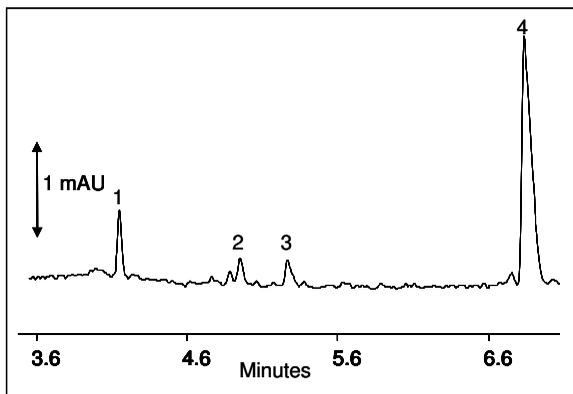


Figura 4.3. Eletroferograma experimental de uma amostra de uísque 12 anos autêntico. Identificação dos ácidos: 1) fórmico, 2) glicólico, 3) láctico, 4) acético. Condições experimentais: capilar com 60 cm de comprimento total (50 cm até o detector) e 50 μm de D. I.; eletrólito constituído de 8,5 mmol L^{-1} TRIS, 10 mmol L^{-1} DNB, 0,2 mmol L^{-1} CTAB; detecção indireta em 254 nm; tensão de 20 kV (polaridade negativa).

4.3.3 Características analíticas do método

Baseando-se no *screening* das 30 amostras de uísque, os ácidos alifáticos quantificados foram o fórmico, glicólico, láctico e acético. Para confirmar a hipótese de que bebidas que passam pelo processo de fabricação adequado possuem concentrações elevadas destes ácidos, foram feitas curvas de calibração com soluções padrão dos ácidos em questão, cujos parâmetros de validação estudados são mostrados na Tabela 4.2.

As curvas de calibração para os quatro ácidos determinados mostraram bom coeficiente de determinação na faixa estudada. Os pontos da curva de calibração, assim como as amostras foram repetidos duas vezes. As curvas de calibração indicaram boa correlação entre a área dos picos e a concentração dos ácidos e os coeficientes de determinação foram superiores a 0,9900 para os quatro analitos.

Tabela 4.2. Figuras de mérito das curvas de calibração dos ácidos. Condições analíticas conforme Figura 4.3.

Ácido	Faixa Linear*	R ²	LOD*	LOQ*
Acético	10,0 – 202,5	0,9993	12,5	41,7
Láctico	0,90 – 17,50	0,9900	2,61	8,69
Glicólico	1,33 – 6,50	0,9916	0,68	2,25
Fórmico	1,20 – 24,50	0,9979	1,39	4,64

*mg L⁻¹

4.3.4 Análise das amostras

Entre as amostras de uísque analisadas, as dez amostras autênticas mais a adquirida no comércio mostraram um perfil eletroforético semelhante, ou seja, apresentando os compostos que eram esperados de ser encontrados em um uísque que passou por um processo de fabricação adequado.

No entanto, as amostras apreendidas por suspeita de falsificação apresentaram perfis diversos entre si, além de divergirem dos autênticos. Por exemplo, as amostras de uísque 12 anos possuem alguns compostos não identificados que os seus respectivos autênticos não possuem, enquanto que o teor de ácido acético encontrado nestas amostras foi muito inferior as das amostras originais (Figura 4.4). Por outro lado, a comparação das amostras de uísque oito anos com as suas respectivas originais mostram, como única semelhança, a presença dos ácidos fórmico e acético, mas numa concentração bem inferior (Figura 4.5).

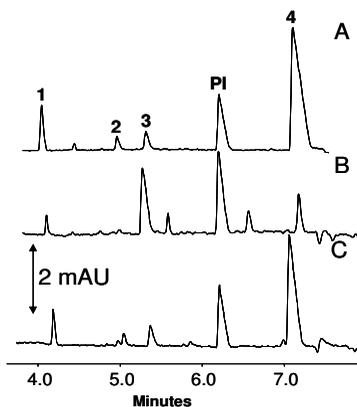


Figura 4.4. Comparação entre o eletroferograma do ponto da curva de calibração (A) correspondente às concentrações $19,71 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido fórmico (1), $5,30 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido glicólico (2), $13,93 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido láctico (3) e $162,00 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido acético (4) e os de amostras de uísque doze anos, da mesma marca, porém (B) apreendido por suspeita de falsificação e (C) autêntico. PI = ácido succínico. Condições experimentais conforme Figura 4.3.

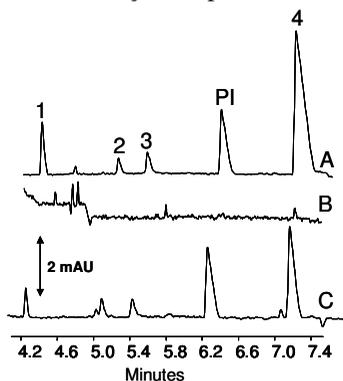


Figura 4.5. Comparação entre o eletroferograma do ponto da curva de calibração (A) correspondente às concentrações $19,71 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido fórmico (1), $5,30 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido glicólico (2), $13,93 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido láctico (3) e $162,00 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido acético (4) e os de amostras de uísque oito anos, da mesma marca, porém (B) apreendido por suspeita de falsificação e (C) autêntico. PI = ácido succínico. Condições experimentais conforme Figura 4.3.

A quantificação dos uísques originais confirma que bebidas autênticas possuem os compostos analisados em concentrações acima do

limite de quantificação, enquanto que as amostras apreendidas não possuem os ácidos ou se encontram abaixo do limite esperado, salvo algumas exceções, como é apresentado na Tabela 4.3. Um fato curioso foi a concentração muito superior de ácido láctico encontrada em seis amostras, quando comparadas com os uísques originais, sendo que estas amostras são de uísques envelhecidos doze anos.

Tabela 4.3. Faixa de concentração (mg L^{-1}) dos ácidos orgânicos, obtidas pelo método proposto por eletroforese capilar. Condições experimentais conforme Figura 4.3.

Ácido	Amostras apreendidas	Uísques autênticos
Fórmico	0,00 – 39,28	9,63 – 35,59
Glicólico	0,00	4,36 – 10,30
Láctico	0,00 – 134,02	7,71 – 26,30
Acético	0,00 – 61,20	112,90 – 453,38

4.3.5 Análise por componentes principais

Para o tratamento estatístico feito através da análise por componentes principais, os dados relativos aos ácidos alifáticos considerados como variáveis foram as concentrações obtidas pela quantificação, sendo que este estudo se aplicou somente às amostras nas quais se detectou os analitos, independente das amostras serem autênticas ou suspeitas (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Concentrações (mg L^{-1}) dos analitos usadas na análise por componentes principais.

Amostra	Fórmico	Glicólico	Láctico	Acético
1	12,65	0,00	113,43	49,86
2	25,95	5,90	9,43	350,94
3	27,23	5,39	13,84	312,90
4	39,28	0,00	82,37	44,98
5	33,39	9,86	15,83	292,40
6	33,48	9,27	19,62	313,64
7	20,56	8,66	12,30	176,40
8	19,68	9,24	17,09	164,29
9	22,70	10,30	16,47	176,21
10	12,64	0,00	85,09	41,66
11	19,69	0,00	134,02	61,20
12	26,96	6,17	8,46	340,27
13	11,83	0,00	95,02	45,04
14	35,59	4,36	7,71	453,38
15	32,32	8,53	26,30	292,79
16	11,29	0,00	80,37	40,35
17	9,63	0,00	0,00	112,90

A análise de componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixos mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma dos n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação [16-18].

A análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico [16-18].

As quatro componentes principais para os ácidos considerados são:

$$\hat{Y}_1 = 0,0442 (\text{fórmico}) + 0,0201 (\text{glicólico}) - 0,2458 (\text{lático}) + 0,9680 (\text{acético})$$

$$\hat{Y}_2 = -0,0760 (\text{fórmico}) + 0,0487 (\text{glicólico}) - 0,9658 (\text{lático}) - 0,2428 (\text{acético})$$

$$\hat{Y}_3 = -0,9871 (\text{fórmico}) - 0,1363 (\text{glicólico}) + 0,0552 (\text{lático}) - 0,0619 (\text{acético})$$

$$\hat{Y}_4 = 0,1331 (\text{fórmico}) - 0,9892 (\text{glicólico}) + 0,0601 (\text{lático}) - 0,0008 (\text{acético})$$

As porcentagens de variância total explicadas pelas componentes são, respectivamente, 95,98% para \hat{y}_1 ; 3,74% para \hat{y}_2 ; 0,23% para \hat{y}_3 e 0,035% para \hat{y}_4 . Juntas, as componentes \hat{y}_1 e \hat{y}_2 representam aproximadamente 100% da variância total. Portanto, as informações mais relevantes estão contidas nessas duas componentes principais, uma vez que a terceira e a quarta componente contribuem muito pouco para a variância total original.

O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para a observação dos pontos no espaço n-dimensional. Analisando o gráfico de escores da primeira e segunda componentes principais (as quais representam

aproximadamente 100% da variância total) é possível agrupar as amostras que apresentam características semelhantes.

O estudo do gráfico de escores mostra que a análise por componentes principais possibilitou a distinção entre os uísques autênticos envelhecidos 8 e 12 anos, assim como, a diferenciação entre as amostras autênticas e suspeitas. Além disto, o tratamento estatístico, separou dos grupos de amostras, um uísque de fabricação nacional que é envelhecido somente 1 ano (amostra 17) e um uísque produzido a partir de um processo de fabricação diferente dos demais (amostra 14), (Figura 4.7).

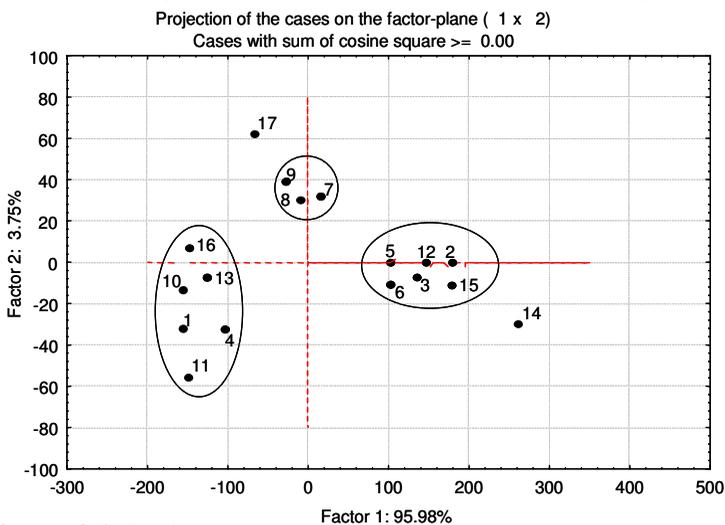


Figura 4.6. Gráfico de escores da primeira (ác, acético) e segunda (ác, fórmico) componentes principais (as quais representam aproximadamente 100% da variância total). Amostras: 7,8,9 = uísques originais oito anos, 2,3,5,6,12,15 = uísques originais doze anos, 1,4,10,11,13,16 = uísques apreendidos doze anos. No presente caso as amostras 14 e 17 ficaram fora dos agrupamentos.

4.4 Conclusão

O método proposto se mostrou satisfatório na determinação dos ácidos alifáticos detectados nas amostras de uísque.

O uso de “softwares” de simulação possibilitou a identificação dos analitos sem a necessidade de adição de padrões, economizando reagentes, amostras, padrões e tempo de análise.

A utilização da eletroforese capilar associado à PCA mostrou-se uma ferramenta poderosa na autenticação de amostras de uísques. A

análise estatística permitiu agrupar as amostras em verdadeiras e falsas diferenciando ainda as amostras autênticas em 1, 8 e 12 anos de maturação.

4.5 Referências bibliográficas

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

[2] CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 319–331, 2002.

[3] ESTEVES, V. I.; LIMA, S. S. F.; LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 163–167, 2004.

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

[5] GONZÁLEZ-ARJONA, D.; GONZÁLEZ-GALLERO, V.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 381, p. 257-264, 1999.

[6] NG, L-K.; LAFONTAINE, P.; HARNOIS, J. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages, Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 29–38, 2000.

[7] KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; TOMITA, E.; TAKAMURA, K.; KUSU, F. Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1440–1444, 2004.

- [8] GABRIEL, R.; KESSELMEIER, J. Apoplastic solute concentrations of organic acids and mineral nutrients in the leaves of several fagaceae. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, p. 604-612, 1999.
- [9] WANG, M.; QU, F.; SHAN, X-Q.; LIN, J-M. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 285-292, 2003.
- [10] MORENO, M. V. G.; JURADO, C. J.; BARROSO, C. G. Determination of organic acids by capillary electrophoresis with simultaneous addition of Ca and Mg as complexing agents. **Chromatographia**, v. 57, p. 185-189, 2003.
- [11] SAAVEDRA, L.; BARBAS, C. Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2235-2243, 2003.
- [12] PERES, R.G.; MORAES, E.P.; MICKE, G.A.; TONIN, F.G.; TAVARES, M.F.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**, v. 20, p. 548-552, 2009.
- [13] BIANCHI, F.; CARERI, M.; CORRADINI, C. Novel approach for the rapid determination of water-soluble organic acids in wine by co-electroosmotic flow capillary zone electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 898-904, 2005.
- [14] SING FUNG, Y.; MAN LAU, K. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3224-3232, 2003.
- [15] DOBLE, P.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Design of background electrolytes for indirect detection of anions by capillary electrophoresis. **Trends Anal, Chem**, v. 19, p. 10-17, 2000.
- [16] SÁDECKÁ, J.; MÁJEK, P.; TÓTHOVA, J. CE Profiling of organic acids in distilled alcohol beverages using Pattern Recognition Analysis. **Chromatographia**, v. 67, p. S69-S74, 2008.

- [17] MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.
- [18] PARK, Y. J.; KIM, K. R.; KIM, J. H. Gas chromatographic organic acid profiling analysis of brandies and whiskeys for Pattern Recognition Analysis. **J, Agric, Food Chem**, v. 47, p. 2322-2326, 1999.
- [19] PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J. 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, p. 57-64, 2004.
- [20] CORTACERO-RAMÍREZ, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; de CASTRO, M. H-B.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 115-119, 2005.
- [21] MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, p. 1175-1188, 2005.
- [22] HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y. Table of isotacophoretic indices. Simulating qualitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3-10. **Journal of Chromatography**, v. 271, p. D1-D106, 1983.