

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SEPARAÇÃO  
DE CARBOIDRATOS PREDOMINANTES EM ALIMENTOS POR  
ELETROFORESE CAPILAR**

**ADRIANA DILLENBURG MEINHART  
Química Industrial de Alimentos**

**Profa. Dra. HELENA TEIXEIRA GODOY  
Orientadora**

**Prof. Dr. ROY EDWARD BRUNS  
Coorientador (IQ-UNICAMP)**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.**

**Campinas  
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M477d Meinhart, Adriana Dillenburg  
Desenvolvimento de metodologia para separação de carboidratos  
predominantes em alimentos por eletroforese capilar / Adriana  
Dillenburg Meinhart . -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Helena Teixeira Godoy  
Co-orientador: Roy Edward Bruns  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

1. Carboidratos. 2. Eletroforese capilar. 3. Separação. 4.  
Alimentos. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfca

Título em inglês: Method development for the separation of carbohydrates predominant  
in foods by capillary electrophoresis

Palavras-chave em inglês (Keywords): Carbohydrates, Capillary electrophoresis, Separation,  
Foods

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Roger Wagner

Juliana Azevedo Lima-Palline

Regina Prado Zanes Furlani

Carolina Schaper Bizzatto

Data da Defesa: 20/08/2010

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

**Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em 20/08/2010 por Adriana Dillenburg Meinhart, aprovado pela comissão julgadora em 20/08/2010.**

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy - UNICAMP  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Roger Wagner - UFSM  
(Membro)

---

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone - UNICAMP  
(Membro)

---

Dra. Regina Prado Zanes Furlani - ITAL  
(Membro)

---

Dra. Carolina Schaper Bizzotto - UNICAMP  
(Membro)

---

Prof. Dr. José Alberto Fracassi - UNICAMP  
(Membro)

---

Dr. Rodrigo Scherer – Lab. Tommasi Analítica Ltda  
(Membro)

---

Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder - LANAGRO  
(Membro)



Dedico essa tese ao meu filho Augusto por ter sido inspiração e força durante todas as etapas do doutorado, aos familiares que tanto me apoiaram, aos colegas que foram parte deste trabalho, aos professores que sempre se mantiveram dispostos a ensinar e aos amigos que foram parceiros nos momentos de alegrias e dificuldades.



*“Eu fico com a pureza da resposta das crianças*

*É a vida, é bonita e é bonita!*

*Viver, e não ter a vergonha de ser feliz!*

*Cantar e cantar e cantar*

*A beleza de um eterno aprendiz ...*

*(Gonzaguinha)*



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a família. Ao meu filho Augusto, pela sua alegria e pela força que me transmitiu durante toda a sua existência. André, pelo amor, companheirismo e carinho. Sem vocês eu não teria conseguido! Agradeço à minha mãe Inês. Mãe, você é o exemplo de guerreira que eu sempre quero seguir. Dentre tantas coisas, agradeço pelo seu exemplo de bravura e pela sua dedicação aos filhos! Ao meu pai Antônio, obrigada pelo apoio e incentivo. À Isabel, você é a irmã, amiga, tia amável e companheira para tudo. Você, o Ronei e a Joana foram muito importantes em cada momento dessa conquista. Rodrigo e Maria, vocês são o exemplo de determinação que eu sempre quero seguir: obrigada pelos momentos de companheirismo. Aos avós, Ana e Claudino Frederico, agradeço pelo apoio, carinho e amor. Aos avós Maria e Olmiro, obrigada por tudo! Tia Alice e Tarcísio: sem vocês eu não estaria aqui hoje, sou eternamente grata pelo carinho e proteção que sempre me concederam.

À professora Helena Teixeira Godoy, pela orientação deste trabalho e, principalmente, pela paciência que teve, pelo exemplo que demonstrou, pelo profissionalismo, amizade, carinho e por ser uma grande mãe! Ao prof. Roy Edward Bruns, pela coorientação, pela paciência, seriedade, compromisso e dedicação: obrigada! Aos professores Juliana A. L. Pallone, Marcelo A. Prado, José M. Soares, Raul Vicenzi, Gislaine Hermanns, Márcio F. Cunha e Ido Willems, obrigada pela convivência, ensinamentos e momentos de alegria. Vocês foram e são muito importantes para a minha formação!

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e observações que foram muito relevantes para melhorar este trabalho. Muito obrigada pela atenção!

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sem elas, esse estudo não seria possível.

Ao seu Dirceu: Muito Obrigada! Sem a sua eficiência e dedicação, esse trabalho não teria sido possível. Às técnicas Cristina e Gislaine, ao Cosme e ao Marcos, obrigada por toda a ajuda e dedicação.

Aos amigos de muitos anos: Ester, Solange, Luciana, Juarez, Édio, Sr. Edgar, Fábio e Davi. Apesar da distância, eu não poderia deixar de lembrar de vocês, pois vocês se tornaram parte da minha vida! Obrigada por tudo!

Dentre os colegas, agradeço especialmente aos companheiros de trabalho Carol e Cristiano: vocês se tornaram muito mais que colegas, se tornaram amigos, parceiros de aprendizado, de farras e desabafos. Sem vocês esta tese não seria da mesma forma, obrigada! Aprendi muito com vocês! Às amigas que conheci durante o doutorado: Ciça, Merenice e Dani Pane, pelos conselhos, conversas e apoio, vocês foram muito importantes. Ao Rodrigo e ao Roger, pelos ensinamentos e momentos de alegria. À Cláudia, pelo exemplo de dedicação, à Elede, Dani Bio, Vivian, Romina, Stanis, Cíntia, Raquel, Lucíula, Polly, Dani Ferreira, Paula, Milene, Marla, Janclei, Carlos, Sabrina, Pedro, Natália, Joyce, Juliana, Graziela, Jéssica, Fernanda, Aparecido e demais colegas, obrigada pela amizade e convivência.

A todos que não foram citados através de nomes, mas que lembro com muito carinho e sou profundamente grata pelo apoio!

**RESUMO**

Os carboidratos são compostos muito abundantes na natureza. Estão presentes em todas as etapas evolutivas, tanto em vegetais como animais. Quaisquer reações, de anabolismo ou catabolismo envolvem, de alguma forma, algum carboidrato. Na indústria alimentícia são responsáveis por diversos fenômenos que promovem efeitos químicos, físicos e sensoriais nos alimentos. A importância destes compostos acompanha etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, a formulação, o processamento, as características do produto final até o tratamento dos resíduos gerados. São compostos de ações biológicas e tecnológicas distintas, mas de características físico-químicas semelhantes e, por isso, de difícil separação. Diversos métodos já foram desenvolvidos para a análise desses compostos. No entanto, dentre a literatura pesquisada, nenhum método investigou a possibilidade de separação simultânea dos 13 carboidratos geralmente encontrados em alimentos: glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. Nesse estudo, foram avaliados os efeitos de três diferentes metodologias na separação desses compostos, envolvendo eletroforese capilar de zona, cromatografia eletrocínica micelar com tensoativo catiônico e tensoativo aniônico. Foram investigados diversos fatores que possam influenciar na separação, dentre eles, o tipo e a concentração do eletrólito, o pH, a concentração de surfactante, a voltagem, temperatura, adição de outros sais como tetraborato de sódio, fosfato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio e a adição de

solventes orgânicos como etanol e acetonitrila. Foram utilizadas técnicas estatísticas multivariadas para a otimização do pH, da concentração do eletrólito e do tensoativo. Através da função de Derringer e Suich foi possível realizar a avaliação simultânea de várias respostas e prever as condições analíticas das metodologias de separação. Utilizando a eletroforese capilar de zona foi possível obter a separação de 8 compostos, por cromatografia eletrocínética micelar contendo surfactante catiônico foi possível separar 9 compostos (sacarose, lactose, lactulose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose), enquanto que utilizando tensoativo aniônico foi obtida a separação dos 13 compostos. Os métodos estatísticos multivariados se apresentaram como uma valiosa ferramenta para o tratamento dos dados e a predição matemática das condições ótimas de separação. Além disso, permitiram a redução do número de experimentos aliada a obtenção de um grande número de informações a respeito dos sistemas estudados.

**ABSTRACT**

The carbohydrates are compounds very abundant in nature. They are present in all evolutionary steps, both in vegetables and animals. Any metabolism or synthesis reaction involves, in some way, a carbohydrate. In food industries, carbohydrates are compounds responsible for several phenomena that promote chemical, physical and sensorial effects. These compounds are important in raw material obtention, formulation, processing, final product characteristics and generated residue treatment. They are compounds having different biological and technological actions, but with similar physico-chemical characteristics and, for this reason, are hard of separate. Several methods have been developed for the analysis of these compounds. However, in the research literature, no method investigating the possibility of simultaneous separation of the 13 carbohydrates commonly found in foods: glucose, fructose, sucrose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, mannose, maltose, xylose, ribose and maltotriose was found. In this work, three different methodologies for the separation of these compounds were evaluated, involving capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography with cationic and anionic surfactants. Several factors that could influence the separation were assayed, electrolyte type and concentration, voltage, temperature, addition of sodium tetraborate, sodium phosphate, sodium acetate and sodium chloride salts and addition of organic solvents like ethanol and acetonitrile. Multivariate statistical techniques were used to optimize pH and electrolyte and surfactant concentrations. Employing the

Derringer and Suich desirability function it was possible to make a simultaneous evaluation of several responses and predict the optimum analytical conditions of separation. Using the method of capillary zone electrophoresis it was possible to obtain the separation of 8 compounds, by micellar electrokinetic chromatography containing cationic surfactant. It was possible to separate 9 compounds (sucrose, lactose, lactulose, glucose, arabinose, mannose, fructose, xylose and ribose), when using an anionic surfactant. it was obtained the 13 compounds separation. The multivariate statistical methods were a valuable tool for data treatment and for mathematical prediction of the optimum separation conditions. Moreover, they allowed a reduction in number of experiments as well as the obtention of a great amount of information concerning the studied systems.

**SUMÁRIO**

<b>Introdução Geral.....</b>	<b>01</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>Capítulo 1: Carboidratos em alimentos: Propriedades e Métodos de separação.....</b>	<b>13</b>
Resumo.....	14
1 Importância do controle dos carboidratos nos alimentos.....	16
2 Restrições a ingestão de carboidratos.....	20
3 Propriedades físico-químicas dos carboidratos.....	22
4 Métodos para análise de carboidratos.....	25
5 Estudos multivariados de sistemas.....	33
6 Conclusão.....	35
7 Referências bibliográficas.....	37
<b>Capítulo 2: Estudo de três metodologias na separação simultânea de 13 carboidratos presentes em alimentos.....</b>	<b>45</b>
Resumo.....	46
1 Introdução.....	48
2 Material e Métodos.....	56
3 Resultados e Discussão.....	60
4 Conclusão.....	72
5 Referências Bibliográficas.....	73
<b>Capítulo 3: Otimização multivariada da separação de 13 carboidratos presentes em alimentos por eletroforese capilar com fluxo inverso .....</b>	<b>77</b>
Resumo.....	78
1 Introdução.....	80

2 Material e Métodos.....	85
3 Resultados e Discussão.....	88
4. Conclusão.....	96
5 Referências Bibliográficas.....	96
<b>Capítulo 4: Otimização multivariada de seis diferentes metodologias para a separação de carboidratos em alimentos utilizando o método de derringer e suich na predição matemática das condições analíticas.....</b>	<b>103</b>
Resumo.....	104
1. Introdução.....	106
2. Materiais e Métodos.....	109
3. Resultados e Discussão.....	114
4 Conclusão.....	126
5. Referências Bibliográficas.....	127
<b>Capítulo 5: Otimização multivariada da separação simultânea de treze carboidratos por mekc com tensoativo aniônico.....</b>	<b>135</b>
Resumo.....	136
1. Introdução.....	138
2. Materiais e Métodos.....	142
3. Resultados e Discussão.....	146
4 Conclusão.....	155
5 Referências Bibliográficas.....	156
<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>161</b>

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Os carboidratos (CHOs) estão presentes em grande quantidade em quase todos os alimentos e contribuem com 40 a 50% da ingestão calórica do ser humano [1]. A glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose são os CHOs mais comuns em alimentos como frutas, leites, farináceos, grãos, cereais, verduras, mel e seus produtos derivados.

A composição de CHOs nos alimentos tem sido observada com maior frequência entre os consumidores devido ao aumento de quadros clínicos estreitamente relacionados com a alimentação. Em destaque estão a obesidade, que em 2004 foi diagnosticada em 40% da população brasileira adulta [2]; o diabetes que prevalece em 7,6% da população urbana [3]; e o aumento dos casos de intolerância à lactose, sacarose e sacarose-isomaltose em crianças e adultos [1]. Para todos os diagnósticos, os tratamentos clínicos são acompanhados do rigoroso controle da ingestão de CHOs [1].

Os CHOs são grandes aliados da indústria alimentícia, contribuindo decisivamente para a obtenção das características do produto final, tais como, a cor, o aroma e a textura dos alimentos. Cada CHO apresenta características próprias de solubilidade, intensidade de doçura, capacidade de retenção de água e outras. Em função disso, a identificação e quantificação dos carboidratos tornam-se necessárias desde o setor de controle da matéria-prima até a supervisão da qualidade e da composição do produto final.

A composição dos CHOs no vinho, por exemplo, está correlacionada com a conservação do produto final durante a estocagem [4], além de ser fundamental durante a fermentação para a obtenção do teor alcoólico desejado [5]. Em produtos fermentados, são compostos que auxiliam na atividade dos microorganismos. O setor de comercialização dos produtos também é dependente da caracterização dos CHOs. Por exemplo, o suco de laranja concentrado exportado ao Japão, possui o preço baseado no teor de sacarose existente.

Os CHOs são compostos neutros ou ligeiramente ácidos, existindo na forma aniônica somente em pH acima de 11,5, possuem características estruturais muito semelhantes e não absorvem a radiação na região do UV [6-8]. Essas propriedades dificultam a análise desses compostos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica que tem sido empregada com frequência para tal determinação. Para que a separação seja eficiente e a detecção seja possível, alguns autores utilizam reações de derivatização a fim de modificar, complexar ou quelar os carboidratos. Em contrapartida, vários autores citam uma série de desvantagens relacionadas ao processo de derivatização, incluindo a possibilidade de que a reação possa ser diferente para cada um dos analitos, que outros compostos presentes na matriz podem ter comportamento químico semelhante nas condições da derivatização, sendo quantificados como carboidratos, e ainda, que vários carboidratos podem não ser completamente derivatizados [6,9,10].

Com base nessas dificuldades, foram desenvolvidas metodologias por CLAE com detecção por índice de refração, que não requer um procedimento de derivatização [6]. Esse sistema seria perfeito para essa finalidade se não apresentasse alguns inconvenientes como alto ruído, baixa sensibilidade e pouca especificidade para carboidratos, podendo detectar outros compostos que refratam a luz polarizada [10,11]. Outro limitante é que o sistema impossibilita usar condições de gradiente [10], o que limita as possibilidades de separação entre os diversos carboidratos. Não obstante, o detector é muito instável a pequenas variações ambientais [7].

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica em ascensão em vários países. Sua principal característica é que os analitos são separados devido às diferentes mobilidades dadas pelo peso molecular e carga do composto. Como o capilar de sílica fundida utilizado em EC resiste a condições altamente alcalinas, a eletroforese apresenta a vantagem de permitir a ionização dos carboidratos sem reações de derivatização. Para viabilizar a detecção em UV, alguns autores utilizam soluções tampão com eletrólito de fundo, a fim de gerar um pico negativo quando o carboidrato passa na cela do detector. A principal desvantagem da eletroforese é a baixa detectabilidade, que no caso dos carboidratos, que estão presentes, na sua maioria, em grande quantidade nos alimentos, não chega a ser um obstáculo tão relevante. As principais vantagens da EC são a alta eficiência de separação, boa resolução e seletividade, além de apresentar análises rápidas e de baixo custo em reagentes. O equipamento é versátil e apresenta rápida

estabilização às condições de análise. Cabe ressaltar, que a geração de resíduos é mínima e, na maioria dos casos, estes não necessitam de tratamento específico por se tratarem de tampões simples [6,9,12-17].

Em vários países, os pesquisadores vem utilizando a EC com crescente freqüência para determinação de carboidratos. No entanto, há necessidade de desenvolver métodos que permitam a separação dos carboidratos mais comuns nos alimentos. Devido a pouca diferença entre as massas moleculares, estruturas e constantes de dissociação dos mesmos, a análise desses compostos é um desafio analítico. Por isso, em determinadas condições, principalmente ao que tange as faixas de pH, tem-se mobilidades idênticas para carboidratos diferentes. No estudo com tampão constituído de ácido 1-naftil-acético, em pH menor que 12,0, as mobilidades da maltose e glicose são idênticas, conferindo um único pico para os dois analitos [6]. Com tampão de sorbato e brometo de hexadimetrina, em pH 12,2, não foi observada boa resolução entre os picos de manose, ramnose, glicose e galactose [18]. Em tampão sorbato e brometo de cetil-trimetil-amônio, a separação simultânea de galactose, maltose e maltotriose também não foi possível [19]. Em tampão contendo ácido 6-piridina-dicarboxílico também foram verificadas dificuldades de separação [20,21]. Em estudo com solução de borato, foi possível a separação de maltose e galactose. No entanto, foi necessária a utilização de reações de derivatização [22].

O desenvolvimento de uma metodologia simples que permita a separação dos carboidratos mais comuns em alimentos é de extrema necessidade para a

identificação dos mesmos em amostras desconhecidas. Mesmo em matrizes já estudadas, a sobreposição dos picos pode comprometer o resultado analítico. Nos estudos pesquisados, a otimização da separação foi realizada de forma univariada, o que também pode suprimir algumas informações dos efeitos de interação entre as variáveis do sistema de separação.

Tendo em vista as importâncias nutricionais, tecnológicas e mercadológicas dessa análise, neste trabalho foram realizados estudos univariados e multivariados, no sentido de investigar mais profundamente as possibilidades de separação dos 13 CHOs mais comuns em alimentos utilizando a eletroforese capilar.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] FARIAS, F. F; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, v. 8, 2004.
- [2] FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, a. 6, 2006.
- [3] CASTRO, A. G. P. de; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 46, p.280-287, 2002.

[4] TRONCHONI, J.; GAMERO, A.; LÓPEZ-ARROYO, F, N.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 237-243, 2009.

[5] GARCIA-MARTÍN, N.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA-HERAS, M.; PÉREZ-MAGARINO, S. GONZÁLES-HUERTA, D. C.; Evaluation of several ultra- and manofiltration membranes for sugar control in winemaking. *Desalination*, v. 245, p. 554-558, 2009.

[6] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, v. 681, p. 87-97, 1996.

[7] COLLINS, C. H. *Introdução a métodos cromatográficos*. 6ª ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.

[8] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. *Journal of Chromatography A*, v. 1150, p. 312–319, 2007.

[9] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 716, p.231-240, 1995.

[10] KWON, H e KIM, J. Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 215, n. 2, 1993.

[11] DOKI, C.; DRUZIAN, J. I.; SCAMPARINI, A. R. P. Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-IR) em sorvetes de baixas calorias ("diet"/ "light"). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 279-284, 2005.

[12] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry* v. 69, p. 339-344, 2000.

[13] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.

[14] CHONGGONG, F.; LINAN, S.; YUZHI, F. Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. *Analytica Chimica Acta* v. 371, p. 81-87, 1998.

[15] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p. 56-64, 2003.

[16] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.

[17] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p. 99-105, 2007.

[18] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 243-251, 1997.

[19] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 586-594, 2007.

[20] SOGA, T.; IMAIZUMI, M. Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, aminoacids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis* v. 22, p. 3418–3425, 2001.

[21] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* v. 261, p. 73–78, 1998.

[22] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; HILDER, E. F. MACKA, M.; HADDAD, P. R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-

nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v. 27, p. 4039–4046, 2006.



## **OBJETIVOS**

### **1 OBJETIVO GERAL**

Otimizar uma metodologia analítica para a separação de carboidratos em alimentos por eletroforese capilar.

### **2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.1** Otimizar uma metodologia por eletroforese capilar que permita a separação dos 13 carboidratos mais comuns em alimentos: glicose, frutose, sacarose, lactose, lactulose, epilactose, galactose, maltose, manose, arabinose, xilose, ribose e maltotriose;

**2.2** Utilizar métodos multivariados para a otimização dos fatores que influenciam na separação.



## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **CARBOIDRATOS EM ALIMENTOS: PROPRIEDADES E MÉTODOS DE SEPARAÇÃO**

**Adriana Dillenburg Meinhart, Helena Teixeira Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**RESUMO**

Os carboidratos (CHOs) são compostos muito abundantes na natureza. Estão presentes em todas as etapas evolutivas, tanto em vegetais como animais. Quaisquer reações, de anabolismo ou catabolismo envolvem, de alguma forma, algum CHO. Nas indústrias alimentícias os CHOs são compostos responsáveis por diversos fenômenos que promovem efeitos químicos, físicos e sensoriais. A importância destes compostos acompanha etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, a formulação, o processamento, as características do produto final, até o tratamento dos resíduos gerados.

São, nutricionalmente, imprescindíveis à existência da espécie humana já que as rotas metabólicas são dependentes deles. Por isso tem sido alvo de estudos há muitos anos pelos pesquisadores, no sentido de gerar métodos analíticos para separar e quantificar os diferentes de carboidratos presentes em cada alimento.

Nessa breve revisão foram apresentadas as principais características físico-químicas dos mono, di e trissacarídeos mais comuns em alimentos, bem como os principais métodos presentes na literatura para a separação e quantificação de carboidratos em alimentos.

**ABSTRACT**

Carbohydrates (CHOs) are very abundant compounds in nature. They are present in all evolutionary steps, both in vegetables and animals. Any metabolism or synthesis reaction involves, in some way, a carbohydrate. In food industries, carbohydrates are compounds responsible for several phenomena that promote chemical, physical and sensorial effects. These compounds are important in raw material obtention, formulation, processing, final product characteristics and generated residues treatment.

Nutritionally, they are indispensable to human species existence, since metabolic routes depend on them. For this reason, they have been the target of studies for several years, in the development of analytical methods to separate and quantify the different carbohydrates present in each food.

In this short review the main physic-chemical characteristics of the most common mono, di and trisacharides in foods were presented, as well as the principal methods present in literature for separation and quantification of food carbohydrates.

## 1 IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DOS CARBOIDRATOS NOS ALIMENTOS

Os carboidratos são matérias-primas essenciais para a maioria dos alimentos. São indispensáveis no processamento de alimentos fermentados, são os principais constituintes dos cereais e conferem as propriedades reológicas da maioria dos alimentos de origem vegetal. De forma geral, estão intimamente ligados à consistência e à capacidade de retenção de água. Alguns transferem um sabor adocicado ao alimento, de intensidade relacionada aos tipos de carboidratos presentes e suas proporções. No ramo alimentício, as transformações dos carboidratos através da reação de Maillard, da degradação e hidrólise devido ao efeito do pH e do calor, e a caramelização são convenientemente utilizadas para obter as propriedades sensoriais de cor, aroma e textura [1]. Na tabela 1 estão apresentados os principais carboidratos presentes nos alimentos.

O leite e seus derivados fazem parte da dieta brasileira nas diferentes faixas etárias, pois apresentam elevado valor biológico e nutricional. A lactose, o principal CHO do leite, é um dos principais responsáveis pelo aporte energético, principalmente em crianças e adolescentes. Quando o leite e seus derivados passam por aquecimentos excessivos, apresentam a reação de isomerização da lactose formando lactulose e epilactose. Ambas possuem menor valor biológico que a lactose e podem causar reações adversas como flatulências [2-5]. A produção brasileira de leite tem aumentado gradativamente, tanto que o Brasil

passou a ser exportador [6], o que reforça a necessidade do controle de qualidade rigoroso do processo produtivo e do produto final.

Tabela 1: Carboidratos presentes nos alimentos

<b>Carboidrato</b>	<b>Alimentos em que são encontrados</b>	<b>Referência</b>
Xilose	Arroz, cebola, vinho branco, café	[7-9]
Frutose	Sorvete, suco frutas, sucos artificiais, cebola, conservas vegetais, mel, alimentos infantis, chocolate, cereais, vinho branco e tinto, café	[8-18]
Arabinose	Café, cebola, arroz, açaí, vinho branco e tinto	[7-9,19,20]
Maltose	Sorvete, alimentos infantis, cerveja, cereais	[12,15,16,18,21]
Galactose	Alimentos infantis, café, leite e derivados, vinho	[8,9,16,19]
Lactose	Leite e derivados, alimentos infantis	[10,13,16]
Sacarose	Sorvete, sucos, conservas vegetais, iogurte, frutas, alimentos infantis	[10,12,13,16,17]
Manose	Café	[19]
Maltotriose	Cerveja, achocolatado em pó, cereais	[15,21]
Ribose	Café, vinho tinto e branco	[8,9]
Lactulose	Leite e derivados	[2-4]
Epilactose	Leite e derivados	[2-4]
Glicose	Na maioria dos alimentos	-

Dentre os sucos de frutas, o de laranja é o mais consumido no mundo. O suco desta fruta possui antioxidantes naturais que participam ativamente na prevenção de doenças e auxiliam na absorção de alguns nutrientes. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja. Segundo os dados da FAO (Food and Agriculture Organization) [22], em 2007 o Brasil foi responsável por 31,8% de toda a produção mundial. Da mesma forma, o país atende a maior parte da demanda mundial de suco. Tendo em vista que o suco de laranja concentrado é exportado para diversos países e que os preços são baseados no teor de sacarose existente, o controle rigoroso dos níveis de sacarose é imprescindível para sua comercialização.

Na refeição de diversos povos, independente da cultura ou do cardápio, o arroz é um ingrediente quase sempre presente. É consumido em larga escala no Brasil, sendo que em 2002-2003, segundo o IBGE, o consumo *per capita* de arroz foi entre 18 e 29 kg/hab/ano [23]. Dentre os resíduos do beneficiamento do arroz, a casca apresenta um grande volume. Tendo em vista que a casca do arroz é rica em xilose, essa tem sido utilizada em processos de bioconversão de xilose em xilitol, um edulcorante muito utilizado na indústria alimentícia [7].

Os cereais são fontes majoritárias de vitaminas B e fibras, compostos muito importantes em diversas reações metabólicas essenciais e na regulação do trato digestório. Em virtude da exigência sensorial dos consumidores, algumas indústrias tem adicionado sacarose aos cereais, o que limita a ingestão do alimento por pessoas com problemas como o diabetes ou sobre-peso. A análise

desse composto nos alimentos oferecidos pela indústria é de extrema importância para conhecimento dos consumidores com dieta restrita destes nutrientes e para o controle de qualidade do produto final.

O café é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas. Entre 2002-2003, o consumo per capita variou entre 1,9 e 3,2 kg/hab/ano [23], o que corresponde, aproximadamente, entre 23 a 40 litros de café/hab/ano. Especialistas atribuem o crescimento do consumo à melhoria da qualidade do café oferecido, à consolidação do mercado de cafés tipo Gourmet ou Especiais, e devido ao aumento da percepção dos benefícios do café para a saúde. A indústria, na corrida desenfreada por rendimentos econômicos, pode envolver processamentos fraudulentos através da adição de outros grãos, de menor custo, durante o processamento do café. Nesse caso, o pó de café fraudado, após hidrólise, apresenta níveis de glicose muito superiores ao café normal. A dosagem dos níveis de glicose pode servir como indicativo desse processo de adulteração [24].

Os compostos funcionais do vinho destacam essa bebida dentre as alcoólicas. Diversos estudos científicos indicam que o consumo moderado de vinho está correlacionado com a menor incidência de doenças [25], o que desperta cada vez mais o interesse do consumidor por esse alimento. O controle dos níveis de CHOs durante a fermentação é importante para a obtenção do teor alcoólico adequado. Além disso, a presença excessiva de frutose no vinho pode reduzir sua vida de prateleira já que as cepas de leveduras, geralmente utilizadas no processo fermentativo, tem preferência pela glicose [26].

Os alimentos e bebidas citados nesse estudo possuem grande expressividade na alimentação das famílias brasileiras em vista do elevado consumo e da importância nutricional, biológica e funcional. Esse fato eleva a importância de investigar profundamente a composição de carboidratos presentes nos mesmos. A expansão destes mercados exige da indústria um aumento rigoroso do controle dos produtos e das informações declaradas nos rótulos.

## **2 RESTRIÇÕES A INGESTÃO DE CARBOIDRATOS**

Embora os carboidratos sejam uma fonte energética essencial ao metabolismo, algumas pessoas apresentam quadros clínicos que restringem a ingestão de determinados carboidratos.

### **2.1 Intolerância aos carboidratos**

A intolerância é caracterizada por manifestações clínicas que acontecem devido a alterações da digestão e absorção dos carboidratos [27]. Algumas pessoas possuem intolerância a polissacarídeos, como o amido; e outras, a dissacarídeos, como a lactose, a sacarose e sacarose-isomaltose. Ainda, são frequentes os casos de intolerância a monossacarídeos, decorrentes da inadequada absorção primária de glicose-galactose e secundária de monossacarídeos [12].

A intolerância à lactose é um problema muito comum. Pesquisas recentes em uma escola pública de SP indicam que crianças apresentam deficiências semelhantes às encontradas nas populações caucasianas [27].

A intolerância à lactose pode ser decorrente da deficiência congênita, ontogenética ou hipolactasia tipo adulto. No caso de intolerância congênita, a dieta deve ser isenta de lactose no estágio inicial do tratamento [27].

A deficiência congênita de sacarase-isomaltase é a segunda deficiência primária de dissacarídeos mais freqüente, com prevalência entre 0,1 e 0,5% da população. O aumento da sacarose na dieta agrava os sintomas [27].

A intolerância à frutose livre e sorbitol tem sido mais freqüente devido ao aumento do consumo destes compostos, muito utilizados como aditivos dietéticos. Além disso, percebe-se o aumento do consumo de alimentos considerados saudáveis dieteticamente, mas ricos em frutose livre e sorbitol como maçã, pêra, uva, sucos de fruta e grãos [27].

## **2.2 Diabetes**

O diabetes é uma síndrome heterogênea decorrente da falta de insulina no organismo ou da sua incapacidade de exercer adequadamente seus efeitos metabólicos. Sua prevalência no Brasil, na população urbana entre 30 e 69 anos de idade, é de 7,6% (tanto homens quanto mulheres), sendo que esse índice aumenta consideravelmente com o progredir da idade [28].

Segundo a Associação Americana de Diabetes, o tratamento tem como objetivo manter o teor de glicemia próximo dos valores normais, levando em consideração a atividade física, a dieta e a medicação. O controle da glicemia possui uma estreita relação com a alimentação, sendo que muitos pacientes são restritos do consumo de alguns carboidratos [28].

### **2.3 Obesidade**

A obesidade também é um fator que impulsiona a necessidade de controlar rigorosamente o teor e a composição dos carboidratos nos alimentos. Segundo o Ministério da Saúde, em 2004, 40% da população brasileira adulta apresentava algum nível de excesso de peso [29]. Além de fatores genéticos, psicológicos, de doenças e do uso de alguns medicamentos, as principais causas da obesidade são a falta de exercícios físicos e uma dieta sem equilíbrio entre a quantidade de calorias ingeridas e consumidas pelo metabolismo.

## **3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS CARBOIDRATOS**

Os CHOs podem ser definidos como poli-hidroxiáldeídos, poli-hidroxiketonas, poli-hidroxiálcoois, poli-hidroxiácidos, e seus derivados simples, e polímeros desses compostos unidos por ligações hemiacetálicas [1].

Uma das características mais estudadas dos carboidratos é a capacidade que possuem em reduzir soluções alcalinas de  $\text{Cu}^{++}$  e  $\text{Ag}^+$ . Além disso, sofrem

oxidação com oxidantes brandos, como a água de bromo e oxidantes mais energéticos. As cetoses não reagem com oxidantes brandos, mas em presença de oxidantes energéticos, ocorre o rompimento da cadeia com formação de dois ácidos dicarboxílicos [1,16].

Outra reação importante é que os grupos hidroxílicos podem ser facilmente metilados ou acetilados pelos métodos usuais de alquilação e acilação. Quando aquecidos em soluções ácidas, os carboidratos sofrem desidratação com formação de furaldeídos e, posteriormente, hidroximetilfurfural e furfural [1]. Em geral os carboidratos apresentam ponto de fusão entre 100 e 170°C.

Os carboidratos mais comuns em alimentos, alvos desse estudo, são considerados compostos neutros ou ligeiramente ácidos, apresentando ionização somente em pHs acima de 11,5 [13,30]. Não fluorescem nem absorvem a radiação UV, o que exclui os meios mais comuns de detecção empregados [10,30] e apresentam estruturas muito semelhantes. Na figura 1, estão apresentadas as estruturas dos carboidratos mais comuns em alimentos e na tabela 2 as massas moleculares e as constantes de ionização (pKa).

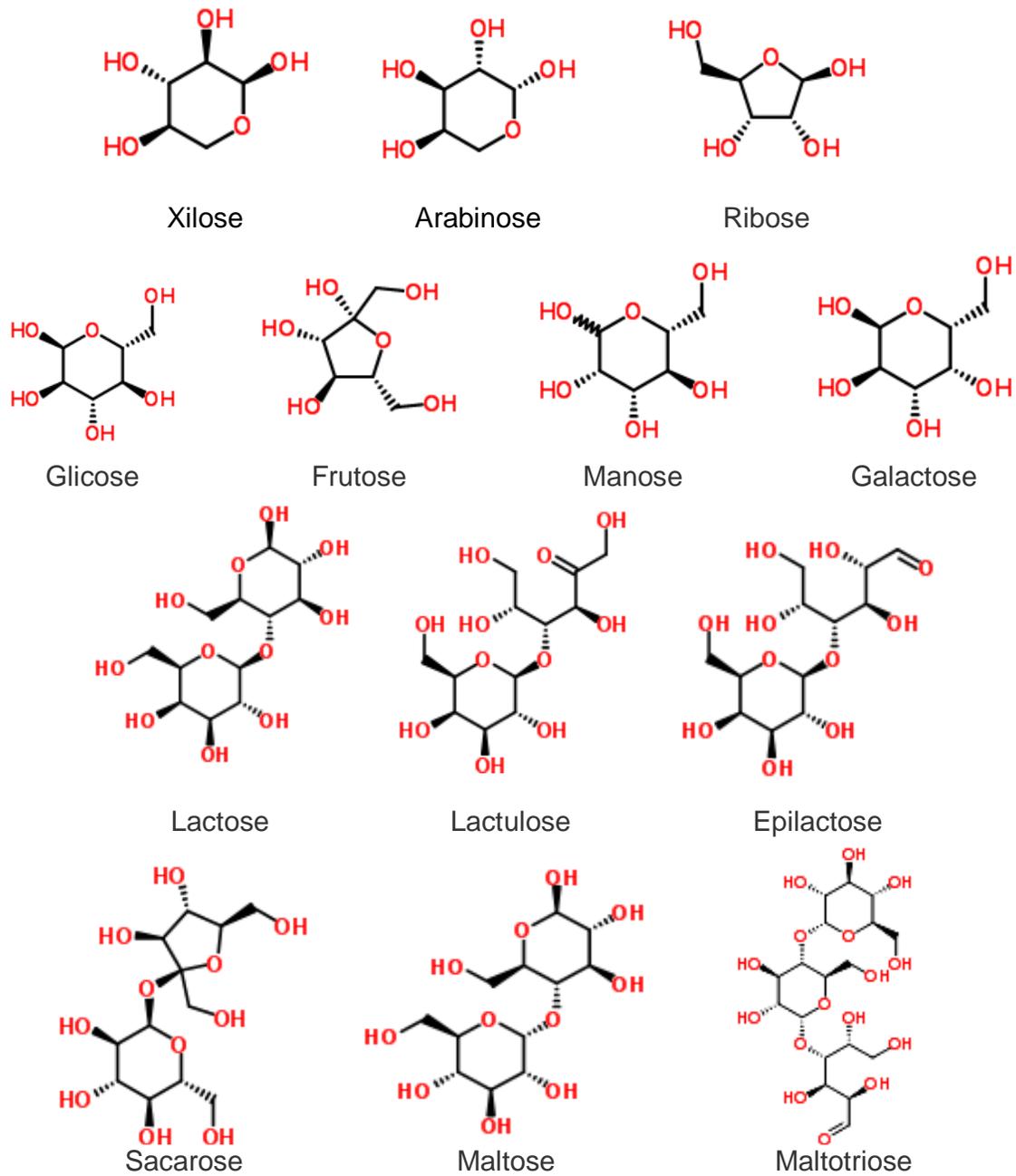


Figura 1: Estruturas dos carboidratos mais comuns em alimentos [31]

Tabela 2. Massas moleculares e constantes de ionização (pKa) dos carboidratos mais comuns em alimentos

<b>Carboidrato</b>	<b>MM*</b>	<b>pKa**</b>
Xilose	150,1	12,15
Arabinose	150,1	12,34
Ribose	150,1	12,21
Frutose	180,2	12,03
Glicose	180,2	12,28
Galactose	180,2	12,35
Manose	180,2	12,08
Lactose	342,3	11,98
Lactulose	342,3	***
Epilactose	342,3	***
Sacarose	342,3	12,51
Maltose	342,3	11,94
Maltotriose	504,4	***

\* Massa Molecular

\*\* pKa em água à 25°C [LEE e LIN, 1996; SOGA e SERWE, 2000]

\*\*\* Valores não encontrados.

#### 4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE CARBOIDRATOS

Com base nas propriedades físico-químicas dos carboidratos, observa-se que são analitos que apresentam dificuldades de separação e detecção. São compostos que possuem estruturas e massas moleculares semelhantes, o que prejudica a separação, além disso a detecção é dificultada por não absorverem a radiação UV [10,11,32].

Para superar esses problemas, os CHOs podem ser submetidos a reações de derivatização com a finalidade de modificá-los e tornar possíveis a separação e detecção. Os agentes derivatizantes mais citados são: 2-aminopiridina, ácido etil p-aminobenzóico, ácido p-aminobenzóico, ester etil p-aminobenzóico na presença de cianoboridrato de sódio, 6-aminoquinolina, 4-aminobenzonitrila, 1-fenol-3-metil-5-pirazolona, 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolinacarboxialdeído) e vários tipos de ácidos sulfônicos de aminonaftaleno [10].

No entanto, os métodos de derivatização são limitados, pois a reatividade pode ser diferente para cada analito. Além disso, mais de um produto pode ser formado para o mesmo analito, resultando em problemas de separação, e outros compostos presentes em amostras complexas podem reagir da mesma forma que os carboidratos, superestimando os resultados. Ainda, a reação de derivatização é, freqüentemente, demorada [10,33].

Os primeiros métodos estudados com propósitos de separação foram a cromatografia em papel e camada delgada. Ambas apresentaram baixa eficiência de separação e pouca precisão para propósitos quantitativos [10,34-36].

A cromatografia gasosa (CG) foi estudada obtendo-se boa eficiência e resolução para sacarose, glicose, frutose e sorbitol [34]. No entanto, a técnica por CG é limitada, pois muitos carboidratos não são voláteis, ou são lábeis ao calor. Além disso, essa técnica geralmente necessita de reações de derivatização demoradas [10].

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos de separação utilizados [10]. Em pesquisas realizadas por CLAE com sistema de separação por troca iônica e detecção amperométrica, foi observada elevada sensibilidade, mas com limitações em seletividade [33].

Utilizando a técnica por CLAE, um grupo de pesquisadores estudou a reação de derivatização de carboidratos com ester etil p-aminobenzóico na presença de cianoboridrato de sódio, que permitiu a separação e detecção em UV, a 254 nm de 13 carboidratos. Apesar do grande número de compostos separados, foi observada a dificuldade de separação entre galactose, glicose e manose [33].

As reações de derivatização são alvos de muitas dúvidas quanto à especificidade e exatidão. A fim de evitá-las, alguns autores passaram a estudar procedimentos analíticos por CLAE com detecção por índice de refração. No estudo de Doki, Druzian e Scamparini, foi obtida a separação de frutose, glicose, sacarose, maltose, lactose, além de sorbitol e glicerol em amostras de sorvete [12]. Outro estudo utilizando o detector por índice de refração mostrou a separação de sacarose, glicose e frutose em polímeros biodegradáveis [37]. A principal vantagem deste detector é que não há necessidade de fazer reações de derivatização, o que torna a análise mais rápida e elimina as dúvidas da reação.

No entanto, vários autores comentam sobre as limitações do uso da detecção por índice de refração. As principais dificuldades destacadas são a baixa sensibilidade e especificidade para carboidratos, podendo detectar outros compostos que refratam a luz polarizada; a necessidade de um controle rigoroso

de temperatura devido às oscilações do sistema e a elevada sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel, que impede o uso de gradiente ocasionando dificuldades de separação [12,33,38]. Além disso, os métodos por CLAE possuem elevado consumo de reagentes e geração de grande volume de resíduos que necessitam tratamento específico, o que aumenta os custos da análise [38,39].

#### **4.1 Aplicação da Eletroforese Capilar na Separação de Carboidratos**

Na técnica por eletroforese capilar a separação dos analitos é baseada na migração diferenciada dos compostos iônicos ou ionizáveis quando estes estão dissolvidos ou suspensos em um eletrólito, através do qual é aplicado um campo elétrico. Desde 1990, a eletroforese capilar vem sendo utilizada em análises de carboidratos em vários países. Embora os carboidratos sejam considerados neutros, eles são ligeiramente ácidos. Em pH acima de 11,5, por exemplo, eles existem na forma aniônica. Nesse pH alto, migram no capilar de sílica fundida para o cátodo [11,32]. O capilar de sílica fundida utilizado suporta o uso de tampões com valores de pH extremos, facilitando a utilização dessa propriedade para obter uma melhor separação dos CHOs em estudo. No entanto, em pHs muito elevados a sensibilidade é comprometida devido ao aumento do sinal do ruído.

Alguns pesquisadores desenvolveram métodos de separação através da formação de complexos dos carboidratos com soluções de borato, em pH de 8 a 10, com detecção em 195 nm, onde foi observada boa separação entre a maltose,

frutose e glicose [40]. Outros pesquisadores citam que o uso de um comprimento de onda tão baixo não é seletivo e podem ocorrer interferências de substâncias carregadas como aminoácidos, peptídeos e proteínas, presentes na amostra [13,32]. Também há trabalhos com derivatização em pré-coluna, apresentando um aumento significativo em sensibilidade e separação. Mas pode ocorrer que os di e trissacarídeos não sejam completamente derivatizados [32]. Outro método proposto foi baseado na quelação com cobre (II) e sulfato de amônio, com detecção UV à 245 nm, que também apresentou bons resultados para a separação de glicose, frutose e sacarose [41]. Recentemente, foi desenvolvido um método com derivatização utilizando p-nitroanilina e eletrólito contendo ácido bórico em pH 9,7 com detecção em 380 nm, onde foram separadas a maltose, rabinose, xilose, lactose, glicose, manose, arabinose, alose e galactose [42].

No intuito de evitar métodos que necessitem a formação de complexos ou reações de derivatização, um grupo estudou a determinação simultânea de carboidratos por EC com detecção amperométrica utilizando um tampão de NaOH e CTAB (brometo de cetil-trimetil-amônio). A determinação simultânea de ácidos e carboidratos (glicose, frutose e sacarose) foi obtida em 14 minutos. O método foi aplicado prosperamente à análise de amostras de uva com precisão satisfatória [14]. Em outros estudos utilizando eletrodo de cobre e detecção amperométrica verificou-se simplicidade e rapidez para determinar sacarose, maltose, glicose e frutose em farinha de arroz [43], lactose em leite em pó [44] e glicose, galactose, arabinose, frutose, xilose e ribose em café [9].

Tendo em vista que os métodos de detecção mais difundidos são a absorção no UV/Vis e fluorescência e que, para o uso desses, seriam necessárias reações de derivatização, alguns autores propuseram métodos por detecção indireta. Neste caso, uma solução contendo um eletrólito que absorve ou fluoresce gera um sinal de fundo elevado e quando o analito, que não absorve ou fluoresce, atinge o detector, ocorre uma queda no sinal, registrado como um pico negativo [39]. Dessa forma foi possível detectá-los sem reações de complexação, quelação ou derivatização.

Em estudos realizados por Serwe e Tomoyoshi [13], a separação foi realizada por EC com solução tampão de ácido 2,6-piridino-dicarboxílico e hidróxido de cetil-trimetil-amônio (CTAH), em pH 12,1. O método não necessita reação de derivatização, ocorrem poucas interferências da matriz e a detecção foi possível em UV à 275 nm. Para as amostras de suco de laranja e iogurte os resultados de reprodutibilidade, linearidade e sensibilidade foram apropriados. O tempo de corrida foi de 20 minutos. Sistemas semelhantes foram utilizados em amostras de glicoproteínas [45] e ouriço do mar [40] apresentando bons resultados. Na pesquisa realizada por Lee e Lin [10], estudou-se a separação de glicose, frutose, ramnose, ribose, maltose, lactose e sacarose em sucos de frutas, produtos lácteos e outros alimentos, utilizando o eletrólito contendo ácido 1-naftilacético em pH 12,2, com detecção em 222 nm. O limite de detecção foi cerca de 0,1 mM e o tempo de corrida foi de 17 minutos.

Em estudo da separação de carboidratos empregando tampão contendo glicilglicina e histidina, com detecção em UV, os pesquisadores estudaram a separação de xilitol, manitol, sacarose, fucose, lactose, celobiose, glicose, arabinose, galactose, maltose, ramnose, xilose, lioxose, frutose, manose e ribose, conseguindo a separação de 10 compostos. Observaram que os picos de lactose e celobiose apresentam mobilidades semelhantes, o que prejudicou a separação. O mesmo ocorreu entre glicose, arabinose, galactose e maltose e com o conjunto xilose, manose e lioxose. Os limites de detecção foram de 24,9 a 66 µg/mL [46].

Também foi realizada a determinação de carboidratos (sacarose, glicose, maltose e frutose) através de EC com detecção UV, sob condições altamente alcalinas por Poppe et al. [32], onde se verificou que o pH alto do eletrólito resultou em forte ruído e instabilidade da linha de base. Os autores concluíram que os problemas estão relacionados à produção de calor e temperatura elevada no capilar. Assim, utilizaram capilares estreitos e baixas voltagens (para obter uma dissipação de calor uniforme ao longo do capilar), obtendo limites de detecção em cerca de 0,5 mmol/L. Os autores verificaram boa reprodutibilidade e robustez.

Zemann [30], utilizou uma solução tampão de sorbato de sódio e brometo de hexadimetrina, em pH 12,2, com detecção em 254 nm e 7,5 cm de comprimento de capilar efetivo. Foi possível a separação de manose, glicose, galactose e rafinose em 1 minuto.

Recentemente, foi publicado um trabalho realizado no Brasil [15] enfocando o estudo em carboidratos por EC. Os pesquisadores desenvolveram

dois métodos, o primeiro para separação de frutose, glicose, maltose, maltotriose, lactose e sacarose, e o segundo, para separação de frutose, glicose, galactose, lactose e sacarose. Os sistemas tampão utilizados foram sorbato, NaOH e brometo de cetil-trimetil-amônio. A diferença entre os dois métodos foi o pH e a concentração do tensoativo. Ambos apresentaram boa resolução, linearidade e sensibilidade.

A eletroforese capilar com ionização em electrospray e detecção por espectrometria de massas foi estudada com êxito na separação de 17 carboidratos, incluindo desoxiribose, arabinose, ribose, xilose, xilitol, fucose, galactose, glicose, manose, frutose, inositol, manitol, sacarose, maltose, rafinose, glicosamina e galactosamina. O método foi aplicado em amostras de vinho, apresentando limites de detecção de 0,5 a 3,0 mg/L. Os carboidratos encontrados em amostras de vinho tinto foram arabinose, galactose, frutose, glicose, inositol e manitol. Em vinho branco, além destes, também foi detectada a ribose e xilose. Os autores destacaram sobre a importância do emprego de metodologias que apresentem boa separação dos picos a fim de identificar todos os carboidratos presentes na amostra [8].

A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) com surfactante aniônico é um modo de separação empregado em diversas análises em alimentos. Bao, Newburg e Zhu [49] observaram bons resultados na separação para oligossacarídeos em leite humano utilizando cromatografia eletrocinética micelar

com o uso de surfactante aniônico. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre a separação de CHOs utilizando esse modo de separação.

A EC possui uma instrumentação simples, proporciona uma separação de alta eficiência (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), boa resolução e seletividade. As análises são econômicas, rápidas, requerem baixo consumo de reagentes (mL) e geram baixos volumes de resíduos. Além disso, na maioria dos casos, os resíduos gerados podem ser descartados sem tratamento. Por isso, esta técnica vem sendo alvo de estudos como uma alternativa para CLAE em muitos campos analíticos [10,32,39,47,48]. A principal desvantagem da EC é a menor detectabilidade devido ao reduzido caminho ótico do capilar. Alguns autores consideram que esse fator não é tão limitante para o estudo de carboidratos já que, na maioria dos alimentos, esses componentes estão presentes em níveis de g/L [13].

## 5 ESTUDOS MULTIVARIADOS DE SISTEMAS

A abordagem clássica para a otimização de sistemas experimentais é o estudo univariado, onde cada parâmetro é modificado individualmente, enquanto que os demais são mantidos fixos. No estudo univariado é possível observar o efeito de apenas um parâmetro a cada alteração de alguma condição do experimento. Já o estudo multivariado de algum sistema analítico ou produtivo apresenta algumas vantagens quando comparado a estudos univariados: é possível avaliar o efeito de interação entre as variáveis, o que traz uma riqueza de

informações muito importantes, permitindo a avaliação de condições intermediárias que apresentem a resposta máxima desejada [50].

A metodologia de superfícies de resposta (RSM) é uma técnica de otimização de sistemas que é baseada em planejamentos fatoriais. Possui duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento. A primeira é feita ajustando-se modelos simples às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. A segunda trata-se do deslocamento ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. [51]

A partir dos trabalhos pesquisados no presente estudo foi observado que vários fatores influenciaram na separação de CHOs, dentre eles o pH, a concentração do eletrólito, concentração do surfactante (se houver), temperatura e voltagem. Além disso, foi possível observar que as respostas a serem observadas são várias, incluindo a resolução entre os picos em estudo, o limite de detecção, a estabilidade do sistema (que envolve a repetibilidade do tempo de migração e da área – importantes para os processos de validação) e o tempo de corrida.

Os planejamentos multivariados contemplam a necessidade de estudar as diferentes variáveis e suas interações. No planejamento multivariado é possível obter um modelo matemático para cada resposta, permitindo assim, a previsão de quais condições do sistema apresentam a resposta máxima. No entanto, quando as respostas são muitas, o ponto ótimo de uma pode ser o inverso de outra. Assim, é preciso encontrar o ponto intermediário que atenda, de forma adequada,

todas as respostas. Derringer e Suich, em 1980, desenvolveram um método para otimizar simultaneamente várias respostas. Esse método se baseia na definição de uma função de desejabilidade, ou seja, para cada uma das respostas são atribuídos valores de desejabilidade, que representarão, matematicamente, a faixa de aceitação da resposta. As funções de desejabilidades são combinadas em uma função global que fornece uma resposta única para o sistema. Ainda, é possível atribuir diferentes desejabilidades ao diversos níveis de respostas, fazendo com que as respostas de maior prioridade sejam mais significativas no cálculo da desejabilidade global [51].

Dentre os trabalhos pesquisados, somente um utilizou sistemas multivariados para otimizar as condições de separação. Nesse estudo foi otimizada a separação simultânea de maltose, rabinose, xilose, lactose, glicose, manose, arabinose, alose e galactose em 16 minutos [42]. Os demais trabalhos pesquisados realizaram otimizações univariadas que podem suprimir algumas informações dos efeitos de interação entre os fatores que afetam a separação.

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos estudos aqui sintetizados, foi possível observar que cada uma das técnicas e os modos de separação já estudados apresentam vantagens e desvantagens. A CLAE, quando comparada à CE se destacou pela sensibilidade enquanto que a CE apresentou melhor resolução e menor geração de resíduos. A CE acoplada a espectrometria de massas se mostrou como uma alternativa

interessante. No entanto, os autores do trabalho otimizaram a separação dos compostos indicando que, mesmo com o acoplamento da espectrometria de massas, a separação é um parâmetro importante devido as semelhanças estruturais dos CHOs; além disso, a espectrometria de massas envolve equipamentos de elevado custo de aquisição e manutenção. Quanto aos modos de separação utilizados, os métodos que envolvem processos de derivatização da amostra podem ocasionar reações incompletas ou pouco seletivas, ao passo que o uso de detectores como índice de refração, UV indireto, amperométricos e condutométricos podem gerar erros de quantificação devido a presença de interferentes da matriz. Como em todas as técnicas analíticas, sempre haverá vantagens e desvantagens a serem avaliadas de acordo com a disponibilidade de equipamentos e com a finalidade da análise.

No que se refere à separação dos carboidratos, foi observado que em diversos métodos apenas alguns compostos foram estudados, obtendo-se uma boa separação. Já nos estudos mais complexos, onde a separação simultânea de vários CHOs foi investigada, alguns pares se mostraram de difícil separação. Esse fenômeno já era esperado devido à semelhança das características físico-químicas desses compostos. No caso de amostras complexas, que contenham diversos CHOs, como alimentos, a sobreposição de picos pode induzir à erros de quantificação.

Vale ressaltar que na maioria dos trabalhos, os estudos de otimização foram realizados de forma univariada, o que indica que se os mesmos fatores

forem estudados com técnicas multivariadas, podem apresentar algum efeito de interação que permita melhores condições de separação.

Por tudo isso, apesar do grande número de trabalhos já apresentados e dos diversos métodos desenvolvidos, a otimização da separação simultânea dos carboidratos é uma linha de pesquisa que ainda pode ser ampliada, já que, no caso de sobreposição de picos em matrizes complexas, a quantificação pode indicar resultados equivocados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. Introdução à química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo, Varela, 1989.

[2] CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I., LÓPEZ-SABATER, C. M. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1043, p. 211-215, 2004.

[3] MESSIA, M.C.; CANDIGLUOTA, T.; MARCONI, E. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hidrolyzed milk. *Food Chemistry*, v. 104, p. 910-917, 2007.

[4] MONTILLA, A.; DEL CASTILLO, M.D.; SANZ, M.L.; OLANO, A. Egg shell as catalyst of lactose isomerisation to lactulose. *Food Chemistry*, v. 90, p. 883-890, 2005.

[5] VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche e productos lácteos: tecnologia, química y microbiología. Zaragoza: Acríbia, 1995.

[6] GOMES, A. L.; PAZ, E. da; PONCHIO, L. A. Perspectivas de consumo de leite no Brasil. Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada, SP, julho-2005.

[7] MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, p. 94-100, 2004.

[8] KLAMPFL, C.W., BUCHBERGER, W. Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. Electrophoresis, v. 22, p. 2737-2742, 2001.

[9] HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L., FANG, Y. Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. Analyst, v. 126, p. 298-301, 2001.

[10] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. Journal of Chromatography B, v. 681, p. 87-97, 1996.

[11] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. Journal of Chromatography A, v. 1150, p. 312–319, 2007.

[12] DOKI, C.; DRUZIAN, J. I.; SCAMPARINI, A. R. P. Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-IR) em

sorvetes de baixas calorias ("diet"/ "light"). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 279-284, 2005.

[13] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 69, p. 339-344, 2000.

[14] CHONGGONG, F.; LINAN, S.; YUZHI, F. Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 371, p. 81-87, 1998.

[15] JAGER A. V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 586-594, 2007.

[16] GOMES, A.M.P.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate Polymers*, v. 37, p. 225-229, 1998.

[17] CHEN, G.; ZHANG, L., WU, X.; YE, J. Determination of mannitol and three sugars in *Ligustrum lucidum* Ait. By capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 530, p. 15-21, 2005.

[18] RAMIREZ, S. C.; CARRETERO, A. S.; BLANCO, C. C.; BERMUDEZ, M. H. de C.; GUTIERREZ, A. F. Indirect determination of carbohydrates in wort samples and

dietetic products by capillary electrophoresis. *Journal of the Science Food and Agriculture*, v. 85, p. 517–521, 2005.

[19] MARTINS, M. C. M.; SILVA, C. O.; BUCKERIDGE, M. S.; VIEIRA, C. C. de J. Carboidratos na bebida do café preparado sob diferentes processos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, p. 382-386, 2005.

[20] BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI S. Identificação e Quantificação das Antocianinas do Fruto do Açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 388-390, 2000.

[21] HERBERTS, R. A.; DARIO, M. G.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Desenvolvimento de um método para avaliar a atividade metabólica de leveduras destinadas à elaboração de cerveja. *Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

[22] Food and Agriculture Organization. FAOStat: Production ([faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)) Consulta em maio, 2010.

[23] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Índices de Preços, Pesquisa de Orçamento Familiares 2002-2003: Primeiros Resultados.

[24] NOGUEIRA, T., LAGO, C. L do. Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 32, p 3507-3511, 2005

[25] FACCO, E. M. P. Compostos Funcionais no Processamento de Vinhos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

[26] TRONCHONI, J., GAMERO, A.; LÓPEZ-ARROYO, F.; N. ; BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the Glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 237-243, 2009.

[27] FARIAS, F. F.; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. *The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición*, v.8, 2004.

[28] CASTRO, A. G.P. de; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, 2002.

[29] FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. *Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica*, a. 6, 2006.

[30] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 243-251, 1997.

[31] ChemSpider.br - Database of Chemical Structures and Property Predictions. Consulta em 25/05/2010.

[32] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 716, p.231-240, 1995.

[33] KWON, H e KIM, J. Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 215, p. 243-252, 1993.

[34] RODRIGUES, A.C.; HERTER, F. G; VERÍSSIMO V.; CAMPOS, A.D. Determinação por Cromatografia Gasosa de Açúcares em Frutíferas de Clima Temperado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 01, 2006.

[35] BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Manual de Laboratório de Química de Alimentos. São Paulo: Varela, 1995.

[36] MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da Composição de Biopolímero por Cromatografia Em Camada Delgada: Metodologia. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 4, p. 222-224, 1998.

[37] ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M. ; NONATO, R. V.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; SANTOS, A. F. dos. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. *Eclética Química*, v. 31, p. 14-19, 2006.

[38] COLLINS, C. H. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.

[39] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.

[40] MORALES, G-C.; SIMONET, B. M.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. On-capillary sample cleanup method for the electrophoretic determination of carbohydrates in juice samples. *Electrophoresis*, v. 28, p. 1557–1563, 2007.

[41] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.

[42] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; HILDER, E. F. MACKA, M.; HADDAD, P. R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v. 27, p. 4039–4046, 2006.

[43] CAO, Y.; WANG, Y.; CHEN, X., JIANNONG, Y. Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry* v. 86, p. 131–136, 2004.

[44] ZHANG, X.; CAO, Y.; YE, J. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 72, p. 385-388, 2001.

[45] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 261, p. 73–78, 1998.

[46] GÜREL, A.; HIZAL, J.; OZTEKIN, O.; ERIM, F.B. CE Determination of carbohydrates using a Dipeptide as Separation electrolyte. *Chromatographia*, v. 64, P. 321–324, 2006.

[47] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p 56-64, 2003.

[48] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p. 99-105, 2007.

[49] BAO, Y.; NEWBURG, D. S; ZHU, L. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from Human Milk by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 370, p. 206–214, 2007.

[50] BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.

[51] BRUNS, Roy. E; NETO, Benício de B.; SCARMINIO, Ieda S. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2º ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTUDO DE TRÊS METODOLOGIAS NA SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA DE 13 CARBOIDRATOS PRESENTES EM ALIMENTOS**

**Adriana D. Meinhart, Cristiano A. Ballus, Roy E. Bruns, Helena T. Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

## ESTUDO DE TRÊS METODOLOGIAS NA SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA DE 13 CARBOIDRATOS PRESENTES EM ALIMENTOS

Adriana D. Meinhart<sup>a</sup>, Cristiano A. Ballus<sup>a</sup>, Roy E. Bruns<sup>b</sup>, Helena T. Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil*

<sup>b</sup> *Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

### RESUMO

O estudo da composição dos carboidratos nos alimentos é importante do ponto de vista nutricional, tecnológico e comercial. Diversos métodos já foram desenvolvidos para a análise desses compostos. No entanto, dentre a literatura pesquisada, nenhum método investigou a possibilidade de separação simultânea dos 13 carboidratos geralmente encontrados em alimentos: glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. Nesse trabalho, foram avaliadas três diferentes metodologias na separação desses compostos. Também foram estudados os

efeitos de outras variáveis que possam interferir na separação. Utilizando o modo de separação por eletroforese capilar de zona foi possível obter a separação de 8 (sacarose, lactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose) dos 13 carboidratos, sendo que foram observadas a coeluição entre a lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose. Através da cromatografia eletrocinética micelar com a utilização de surfactante catiônico foi obtido um perfil de separação idêntico à eletroforese capilar de zona. Nos ensaios utilizando surfactante aniônico foi observada a separação completa de 11 dos 13 carboidratos, com coeluição completa entre a arabinose e manose. A partir dos estudos univariados foi possível observar que o emprego de surfactante catiônico apresentou menor repetibilidade entre as corridas, embora tenha apresentado um sinal analítico maior e menor tempo de análise. A eletroforese capilar de zona e o método com surfactante aniônico apresentaram melhor repetibilidade e foram mais eficazes para a obtenção da separação dos analitos de interesse, embora o tempo de corrida maior tenha sido maior.

## **ABSTRACT**

The study of carbohydrate composition in food is very important from nutritional, technological and commercial point of view. Several methods have been developed for the analysis of these compounds. However, in the research literature, no method investigating the simultaneous separation of the 13

carbohydrates commonly found in foods: glucose, fructose, sucrose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, mannose, maltose, xylose, ribose and maltotriose was found. In this work, three different methodologies for the separation of these compounds were evaluated. The effects of other variables that could interfere in the separation were also studied. Using capillary zone electrophoresis it was possible to obtain the separation of 8 (sucrose, lactose, glucose, arabinose, mannose, fructose, xylose and ribose) of the 13 carbohydrates, with coelution among lactulose, epilactose, maltotriose, maltose and galactose. By using micellar electrokinetic chromatography with a cationic surfactant a separation profile similar to that of capillary zone electrophoresis was obtained. In the assays employing anionic surfactant the complete separation of 11 of the 13 carbohydrates was observed, with overall coelution between arabinose and mannose. From univariate studies it was possible to observe that the use of cationic surfactant presented low repeatability among the runs, although it presented a higher analytical signal and lower analysis time. Capillary zone electrophoresis and the method using anionic surfactant showed better repeatability and were more effective in obtaining the separation of all the analytes of interest, even though they have a higher runtimes.

## 1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos (CHOs) estão presentes em grande quantidade em quase todos os alimentos e contribuem com 40 a 50% da ingestão calórica do ser

humano [1]. A glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose são os CHOs mais comuns em alimentos como frutas, verduras, leite, cereais e derivados.

A composição de CHOs nos alimentos tem sido observada com maior frequência entre os consumidores devido ao aumento de quadros clínicos como a obesidade, diagnosticada em 40% da população brasileira adulta em 2004 [2]; o diabetes, em 7,6% da população urbana [3]; e o aumento dos casos de intolerância à lactose, sacarose e sacarose-isomaltose em crianças e adultos.

Do ponto de vista industrial, o controle da composição dos CHOs é importante por razões tecnológicas, pois esses compostos contribuem decisivamente para a obtenção das características do produto final, tais como a cor, o aroma e a textura dos alimentos. Também estão relacionados com o controle de qualidade pois interferem na conservação dos produtos (como por exemplo, em geléias, frutas cristalizadas, sucos concentrados, vinhos, doces e outros). Em alimentos fermentados, são imprescindíveis para que ocorram as reações necessárias para a obtenção do produto.

Os CHOs podem ser definidos como poli-hidroxiáldeídos, poli-hidroxicetonas, poli-hidroxiálcoois, poli-hidroxiácidos e seus derivados simples, e polímeros desses compostos unidos por ligações hemiacetálicas [4]. São compostos neutros ou ligeiramente ácidos, existindo na forma aniônica somente em pH acima de 11,5. Possuem massas moleculares e características estruturais

muito semelhantes e não absorvem a radiação na região do UV [5-7]. Essas propriedades dificultam a separação e detecção dos CHOs.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que se apresenta como uma boa alternativa para análise de CHOs. Possui uma instrumentação simples, proporciona uma separação de alta eficiência (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), boa resolução e seletividade. As análises são econômicas, rápidas, requerem baixo consumo de reagentes (mL) e geram baixos volumes de resíduos. Além disso, na maioria dos casos, os resíduos gerados podem ser descartados sem tratamento. Por isso, esta técnica vem sendo alvo de estudos para CHOs e vários outros compostos [5,8-11].

Em EC, a separação dos analitos é baseada na migração diferenciada dos compostos iônicos quando estes estão dissolvidos ou suspensos em um eletrólito, através do qual é aplicado um campo elétrico. O capilar de sílica fundida mais comumente utilizado nas análises eletroforéticas suporta o uso de eletrólitos com valores de pH extremos, facilitando a utilização da propriedade de ionização para obter uma melhor separação dos CHOs em estudo [5,8-11].

Dentre os modos de separação já estudados para análise de CHOs, destacam-se a eletroforese capilar de zona e a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), com uso de surfactante catiônico ou aniônico.

Em eletroforese capilar de zona, o capilar é preenchido com um eletrólito e quando aplicado um campo elétrico, os compostos aniônicos possuem mobilidade

individual em direção ao ânodo, no entanto, são carregados pelo fluxo eletrosmótico (FEO) em direção ao cátodo (Figura 1A).

Em MEKC são utilizados agentes tensoativos, que em geral contém um grupo polar e/ou iônico como *cabeça* ligado a uma *cauda* apolar, por exemplo, uma cadeia alifática constituindo um monômero. Em condições apropriadas, os monômeros podem se agregar formando entidades de tamanho coloidal, como vesículas e micelas [12].

Dependendo da natureza do sistema, a incorporação do soluto pela micela pode envolver diferentes regiões da mesma, e pode ocorrer por uma série de mecanismos. Solutos não-polares, ou moderadamente polares se associam ao núcleo hidrofóbico da micela, através de interações dispersivas do tipo dipolo induzido-dipolo induzido, enquanto que solutos polares se associam à superfície da micela, através de interações do tipo dipolo-dipolo ou íon-dipolo com os grupos polares (ou iônicos) da cabeça do tensoativo. Fortes interações coulômbicas (atrativas e repulsivas) podem resultar quando o soluto apresenta carga. Solutos anfifílicos tendem a se alinhar com a micela de forma a interagir dispersivamente com o núcleo hidrofóbico e eletrostaticamente com a cabeça do tensoativo. A extensão com que a associação soluto/micela ocorre determina a ordem de eluição dos compostos [12].

O uso de tensoativos catiônicos ocasiona uma manipulação da carga superficial do capilar ou uma desativação dinâmica que decorre da adsorção física, obtendo como resultado a supressão ou inversão do fluxo eletrosmótico

[12]. Nesse caso, os CHOs migram em direção ao ânodo, na mesma direção do fluxo eletrosmótico (Figura 1B), o que proporciona tempos de análise mais curtos. Quando o surfactante aniônico é utilizado, não ocorrem modificações na parede do capilar. Os CHOs migram ao ânodo, contra o fluxo eletrosmótico, que os “arrasta” ao cátodo. A separação com uso de surfactantes aniônicos ocorre baseada na partição diferenciada dos analitos entre o eletrólito e uma segunda fase composta por micelas (Figura 1C).

Utilizando a eletroforese capilar de zona, alguns pesquisadores desenvolveram métodos de separação através da formação de complexos dos CHOs com soluções de borato, em pH de 8 a 10, com detecção em 195 nm, onde foi observada boa separação entre a maltose, frutose e glicose [13]. Outro método proposto foi baseado na quelação com cobre (II) e sulfato de amônio, com detecção UV em 245 nm [14]. Outro estudo envolveu a derivatização dos CHOs com p-nitroanilina, com separação em eletrólito contendo ácido bórico em pH 9,7 [15].

Em estudos utilizando eletrodo de cobre e detecção amperométrica verificou-se simplicidade e rapidez para determinar sacarose, maltose, glicose e frutose em farinha de arroz [16], lactose em leite em pó [17] e glicose, galactose, arabinose, frutose, xilose e ribose em café [18].

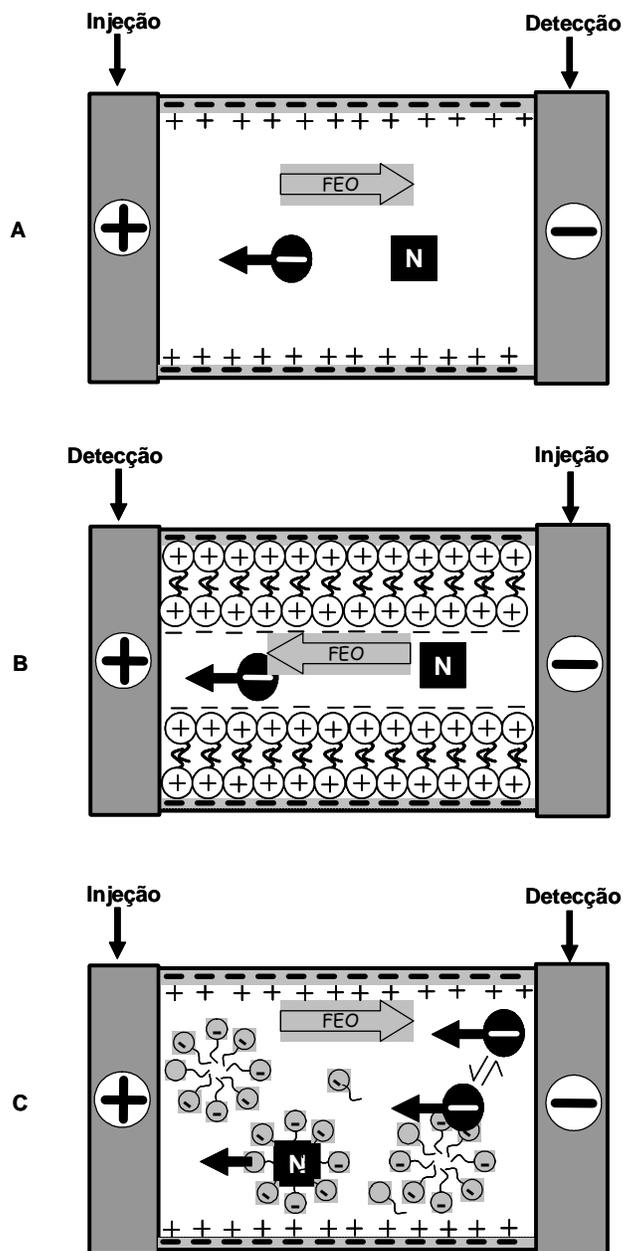


Figura 1: Representação esquemática da migração de analitos neutros e aniônicos através de eletroforese capilar de zona (A), MEKC com tensoativo catiônico (B) e aniônico (C). FEO: Fluxoeletrosmótico; N: Composto neutro;  $\ominus$  Composto carregado negativamente.

Tendo em vista que os métodos de detecção mais difundidos são a absorção no UV/Vis e fluorescência e que, para o uso destes, seriam necessárias reações de derivatização, alguns autores propuseram métodos por detecção indireta. Neste caso, uma solução contendo um eletrólito, gera um sinal de fundo elevado e quando o analito, que não absorve, atinge o detector, ocorre uma queda no sinal, registrado como um pico negativo [10]. Dessa forma, foi possível detectá-los sem reações de complexação, quelação ou derivatização. Na pesquisa realizada por LEE e LIN [5], estudou-se a separação de glicose, frutose, ramnose, ribose, maltose, lactose e sacarose em sucos de frutas, produtos lácteos e outros alimentos, utilizando o eletrólito contendo ácido 1-naftilacético em pH 12,2, com detecção em 222 nm. O limite de detecção foi cerca de  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e o tempo de corrida foi de 17 minutos.

Utilizando MEKC com tensoativo catiônico, Serwe e Tomoyoshi [19] desenvolveram um método com solução tampão de ácido 2,6-piridino-dicarboxílico e hidróxido de cetil-trimetil-amônio (CTAH), em pH 12,1, com detecção em UV à 275 nm. Sistemas semelhantes foram utilizados para a separação de CHOs em amostras de glicoproteínas [20] e ouriço do mar [13] apresentando bons resultados. Zemann [21], utilizou uma solução tampão de sorbato de sódio e brometo de hexadimetrina, em pH 12,2, com detecção em 254 nm e 7,5 cm de comprimento de capilar efetivo. Foi possível a separação de manose, glicose, galactose e rafinose em 1 minuto. Recentemente, foi publicado um trabalho realizado no Brasil [22], enfocando o estudo em CHOs por EC. Os pesquisadores

desenvolveram dois métodos, o primeiro, para a separação de frutose, glicose, maltose, maltotriose, lactose e sacarose, e o segundo, para a separação de frutose, glicose, galactose, lactose e sacarose. Os sistemas tampão utilizados foram sorbato, NaOH e brometo de cetil-trimetil-amônio. A diferença entre os dois métodos foi o pH e a concentração do tensoativo. Ambos apresentaram boa resolução, linearidade e sensibilidade.

A MEKC com surfactante aniônico é um modo de separação empregado em diversas análises em alimentos. Bao, Newburg e Zhu [23] observaram bons resultados na separação para oligossacarídeos em leite humano utilizando MEKC com o uso de surfactante aniônico. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre a separação de CHOs utilizando esse modo de separação.

Apesar dos diversos métodos já apresentados na literatura, não foram encontradas pesquisas envolvendo o estudo da separação simultânea dos 13 CHOs mais encontrados em alimentos. Por isso, nesse trabalho foram avaliados alguns métodos já estudados na literatura quanto ao potencial de separação de glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. Três formas de separação foram estudadas, incluindo eletroforese capilar de zona e MEKC (com uso de surfactante catiônico e aniônico). Além disso, foram avaliados os efeitos de outros parâmetros sobre a separação, envolvendo o tipo e a concentração do eletrólito, o pH, a concentração de surfactante, a voltagem, temperatura, adição de tetraborato de

sódio, fosfato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e adição de solventes orgânicos como etanol, metanol e acetonitrila.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes e soluções**

Os padrões de sacarose (SAC), D-lactose (LAC), lactulose (LTU), epilactose (EPI), maltotriose (MTO), D-(+)-maltose (MAL), D-(+)-glicose (GLU), D-(-)-arabinose (ARA), D-(+)-manose (MAN), D-(-)-frutose (FRU) e D-(-)-ribose (RIB) foram obtidos da Sigma Chemical - EUA. D-(+)-galactose (GAL) e D-xilose (XIL) foram obtidos da Chem Service - EUA. Hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido da Nuclear, ácido 2,6-piridino-dicarboxílico (PDC) e brometo de hexadecil trimetilamônio (citrimida) da Sigma - EUA, tetraborato e acetato de sódio da Ecibra, fosfato de sódio da Synth, cloreto de sódio da Merck, metanol e acetonitrila da J.T. Baker, etanol da Synth, docecil sulfato de sódio (SDS) da Riedel-de-Haën - Alemanha, ácido sórbico (SOR) da Sigma Chemical - EUA. Todos os reagentes utilizados possuem elevada pureza analítica. A água ultrapura foi obtida do sistema Direct Q3 UV (Millipore Corporation, France). Todas as soluções foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) antes da injeção.

## 2.2 Instrumentação

Os experimentos foram executados usando um equipamento de eletroforese capilar Agilent G1600AX com um detector de arranjo de diodos. Foram utilizados capilares de sílica fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro com bulbo estendido com 112 cm de comprimento total (104,5 cm de comprimento efetivo), adquirido da Agilent (Alemanha). Em todos os experimentos, a confirmação dos picos foi realizada mediante adição de padrão para cada um dos compostos em estudo.

## 2.3 Métodos

### 2.3.1 Método por Eletroforese Capilar de Zona

Na primeira etapa do estudo foram realizados experimentos utilizando eletroforese capilar de zona. Os ensaios envolveram o estudo de dois eletrólitos: o ácido sórbico (SOR) e o ácido 2,6-piridino-dicarboxílico (PDC), já utilizados na literatura como eletrólitos para a detecção indireta de CHOs [19,21,22]. Estes absorvem a radiação UV em 254 e 275 nm, respectivamente. Para obter a separação dos CHOs, o eletrólito foi mantido em pH altamente alcalino (acima de 12,0).

Para a avaliação da separação dos 13 CHOs de interesse nesse estudo, inicialmente foi realizada a avaliação da estabilidade dos dois eletrólitos quanto ao pH durante 24 horas. Várias soluções, com o pH variando entre 12,0 e 12,9 foram

preparadas com ambos os eletrólitos. As soluções foram monitoradas quanto a estabilidade do pH através de leituras periódicas. Com o eletrólito que apresentou a melhor estabilidade foi realizada a avaliação do efeito do pH sobre a separação, variando o pH de 12,0 a 12,9, em intervalos de 0,1 de pH. Como o tamanho do capilar e a corrente estão diretamente relacionados à separação, para esses ensaios foi utilizado um capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 112 cm de comprimento total e o máximo de voltagem possível na instrumentação utilizada (30 kV).

### **2.3.2 Método por MEKC: Surfactante Catiônico**

O método estudado por SOGA e SERVE [19], utilizando o modo de separação micelar, com uso de surfactante catiônico, apresentou bons resultados para a separação de vários CHOs, por isso foi reproduzido e avaliado quanto a separação do conjunto de analitos do presente estudo. A separação foi realizada em capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 112 cm de comprimento total, eletrólito contendo 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  de PDC, 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de citrimida, pH 12,1, com temperatura de 25°C, voltagem de 25 kV, injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção indireta em 275 nm (referência em 350 nm).

Após a reprodução das condições ótimas observadas pelos autores, foi realizada a avaliação de forma univariada do efeito da variação de pH de 12,0 a 12,7. O pH que proporcionou a maior quantidade de analitos separados foi fixado para avaliação do efeito da voltagem (entre 15 e 30 kV), da concentração do eletrólito (PDC) em 30, 60 e 75  $\text{mmol.L}^{-1}$  e da concentração de citrimida de 0,5 a 2  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Também foram avaliados os efeitos da adição de tetraborato de sódio

ao eletrólito nas concentrações de 10, 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>, da adição de fosfato de sódio nas concentrações de 10, 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>, acetato de sódio em 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>, de cloreto de sódio em 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>, da adição de solventes orgânicos como etanol, metanol e acetonitrila (de 0,1 a 3%) e da substituição do PDC por 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, como estudado por Jager, Tavares e Tonin [22].

### **2.3.3 Método por MEKC: Surfactante Aniônico**

Outro modo de separação investigado foi um sistema micelar com uso de surfactante aniônico já utilizado por Bao, Newburg e Zhu [23] para separação de oligossacarídeos em leite humano. Os experimentos iniciais foram realizados em condições semelhantes ao modo micelar com uso de surfactante catiônico: capilar de 50 µm de diâmetro por 112 cm de comprimento total, eletrólito contendo 20 mmol.L<sup>-1</sup> de PDC, em pH 12,25, com temperatura de 25°C, voltagem de 25 kV, injeção de 50 mbar durante 5 segundos e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Neste caso, ao invés de adicionar citrimida ao eletrólito, foi adicionado dodecilsulfato de sódio (SDS) em dois níveis, 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>. O método foi estudado com eletrólito empregando PDC e SOR. Utilizando o eletrólito que apresentou melhores condições de separação, foi avaliado o efeito da concentração de SDS, entre 0 e 90 mmol.L<sup>-1</sup>. Fixando a concentração de SDS na condição em que foi obtida a melhor separação, foi realizado o estudo do efeito do pH entre 7,0 e 12,9.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Eletroforese Capilar de Zona

Quanto à estabilidade das soluções contendo SOR e PDC, foi observado que ambos apresentaram variações de pH logo após o preparo, no entanto, uma hora após o preparo, as soluções contendo SOR começaram a estabilizar. Já nas soluções contendo PDC foram observadas variações até 24 horas. Tendo em vista que as análises por eletroforese requerem uma solução eletrolítica com a melhor capacidade tamponante possível, os experimentos seguintes foram realizados utilizando ácido sórbico.

Através do estudo da variação do pH, foi observado que o aumento desta variável esteve diretamente relacionada ao aumento da resolução entre os compostos. Em contrapartida, o aumento do pH apresentou redução da intensidade do sinal analítico e o aumento do sinal do ruído, prejudicando a detectabilidade do método. Em pH 12,7 foi observada a melhor separação, obtendo-se 9 picos bem separados, conforme a Figura 2. As coeluições observadas nos picos 3, 4, 5, 6 e 7 também foram verificadas nos pHs inferiores. O aumento do pH para níveis entre 12,7 e 12,9 não melhorou a separação. Em níveis superiores a 12,7, a altura do sinal do ruído foi muito elevada, inviabilizando a detecção quantitativa dos compostos.

Também foi investigado o efeito da variação da concentração de ácido sórbico, sendo que entre 5 e 30 mmol.L<sup>-1</sup> foi possível observar que o aumento da

concentração melhorou a separação. No entanto, em níveis superiores a 20 mmol.L<sup>-1</sup>, o aumento do ruído inviabilizou a análise dos compostos.

Este método apresentou a separação de 8 compostos, com a coeluição de lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose em um único pico, indicando que o método não separou os CHOs já encontrados em amostras de cereais e leite ou derivados destes. Sob outro aspecto, apresentou boa estabilidade quanto aos tempos de migração (com coeficiente de variação menor que 1%, n=10), tornando-se uma boa alternativa para amostras que não sejam tão complexas, como sucos de frutas, vinhos, arroz e café.

As variáveis que poderiam influenciar positivamente na separação, como o comprimento do capilar, a voltagem, a concentração de SOR e o pH já estavam em seus limites máximos, operacionais ou químicos. Assim, foram investigados outros modos de separação a fim de obter a separação simultânea dos 13 compostos.

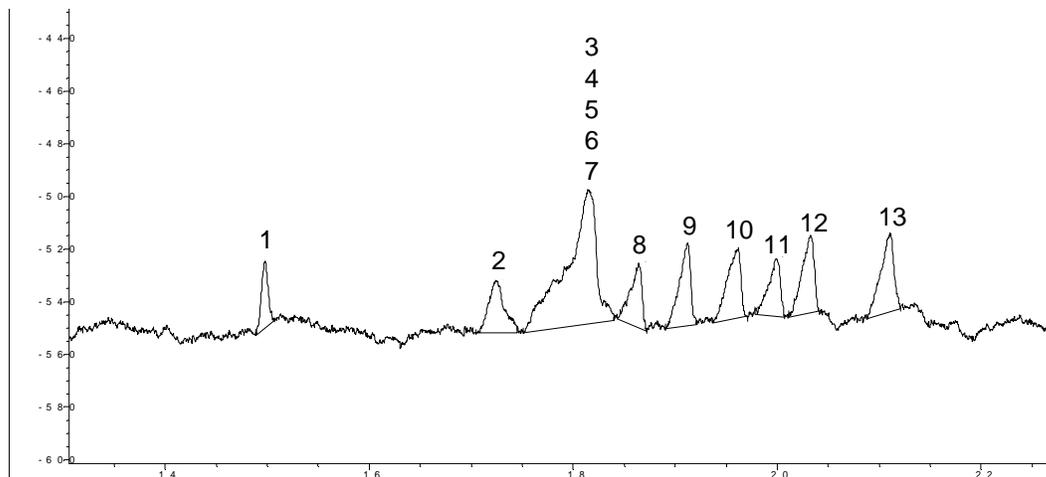


Figura 2: Separação de CHOs com  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido sórbico, pH 12,7, 30 kV,  $25^\circ\text{C}$ , injeção de 50 mbar durante 5 s, capilar de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro por 112 cm de comprimento total e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Mistura de padrões contendo  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Identificação dos picos: 1: Sacarose, 2: Lactose, 3: Lactulose, 4: Epilactose, 5: Maltotriose, 6: Maltose, 7: Galactose, 8: Glicose, 9: Arabinose, 10: Manose, 11: Frutose, 12: Xilose, 13: Ribose

### 3.2 MEKC: Uso de Surfactante Catiônico

Inicialmente foi reproduzida a condição ótima estudada pelos autores Soga e Serwe [19] a fim de verificar a eficiência de separação no conjunto de analitos de interesse neste estudo. Como apresentado na Figura 3, pode-se observar que a condição citada no artigo, permitiu a obtenção de 7 picos dos 13 CHOs de

interesse. Somente os compostos sacarose, lactose, galactose e ribose foram separados totalmente, os demais coeluíram com outros carboidratos.

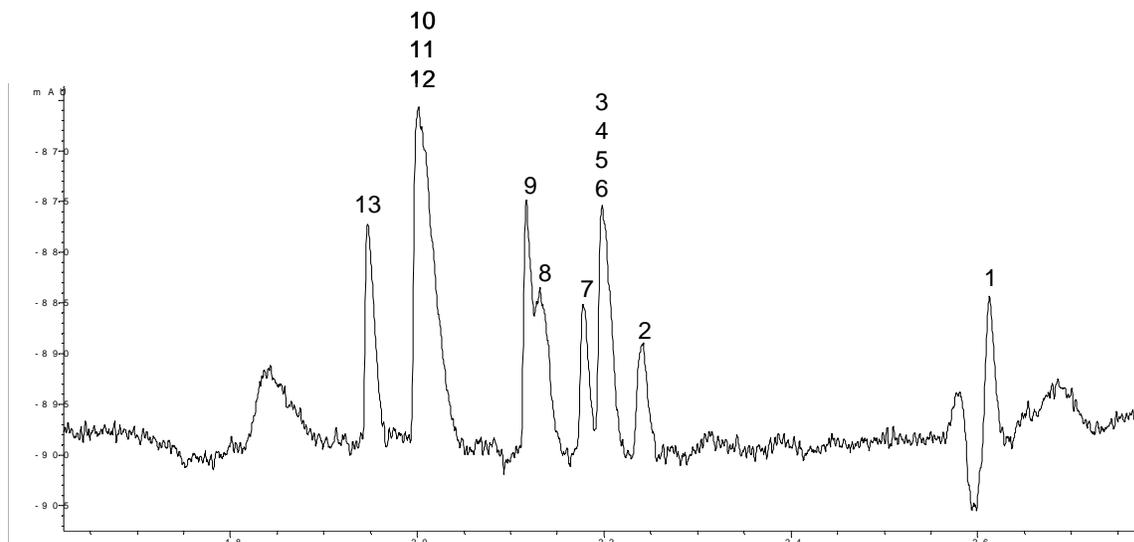


Figura 3: Separação de CHOs com  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de PDC,  $0,5 \text{ mmol.L}$  de CTAB, pH 12,1, 25 kV e  $25^{\circ}\text{C}$ , capilar de  $50 \mu\text{m} \times 112 \text{ cm}$ , injeção de 50 mbar por 5 s e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Mistura de padrões contendo  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Identificação dos picos igual à Figura 2.

Neste modo de separação, como já era esperado devido à reversão do FEO, a eluição dos picos ocorreu na ordem inversa ao modo de separação por zona. Igualmente ao que foi constatado no estudo em eletroforese capilar de zona, o pH foi de grande importância para obter a separação desse conjunto de analitos. Em níveis inferiores de pH as coeluições aumentaram, enquanto que o aumento

do pH melhorou a separação dos picos e também aumentou o ruído. No pH de 12,5 foram verificados 9 picos bem separados, sendo que os compostos 3, 4, 5, 6 e 7 (lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose) coeluíram completamente, ao passo que os compostos 1, 2, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram bem separados. O perfil de separação no pH 12,5 foi semelhante ao perfil verificado no pH 12,7 nos estudos sem o uso de citrimida, por eletroforese capilar de zona. O aumento do pH para níveis maiores que 12,5 elevaram excessivamente o ruído, impedindo a identificação de picos.

Como esse é um modo de separação muito utilizado na literatura, foram investigados os efeitos de mais algumas variáveis para verificar a possibilidade de melhorar a separação. Para esses estudos, o pH utilizado foi de 12,25, que apresentou boa relação entre a separação (8 picos) e baixo ruído. Não foi escolhido o pH 12,5 por se tratar de uma condição com ruído mais elevado, o que poderia comprometer a interpretação de pequenos efeitos das demais variáveis em estudo.

Quanto à variação da voltagem, entre 15 e 30 kV, o aumento apresentou pequenas melhoras na separação (variações de 0,3 na resolução) mas aumentou a altura do sinal do ruído inviabilizando a identificação dos picos. Em 15 kV, além da redução da resolução, ocorreu o aumento da dispersão dos picos e do tempo de corrida para 70 minutos.

O aumento da concentração de PDC para 30, 60 e 75 mmol.L<sup>-1</sup> melhorou a separação chegando a 10 compostos separados quando utilizados 75 mmol.L<sup>-1</sup>, com a coeluição total entre a epilactose, a maltotriose e a maltose. Em contrapartida, o aumento da concentração de PDC ocasionou aumento do ruído, de forma que inviabilizou a identificação dos picos. Além disso, foi observado elevada instabilidade no sistema através da falta de reprodutibilidade entre as corridas e o aumento do tempo de corrida para 50 minutos. Na Figura 4 está apresentado o eletroferograma desta condição.

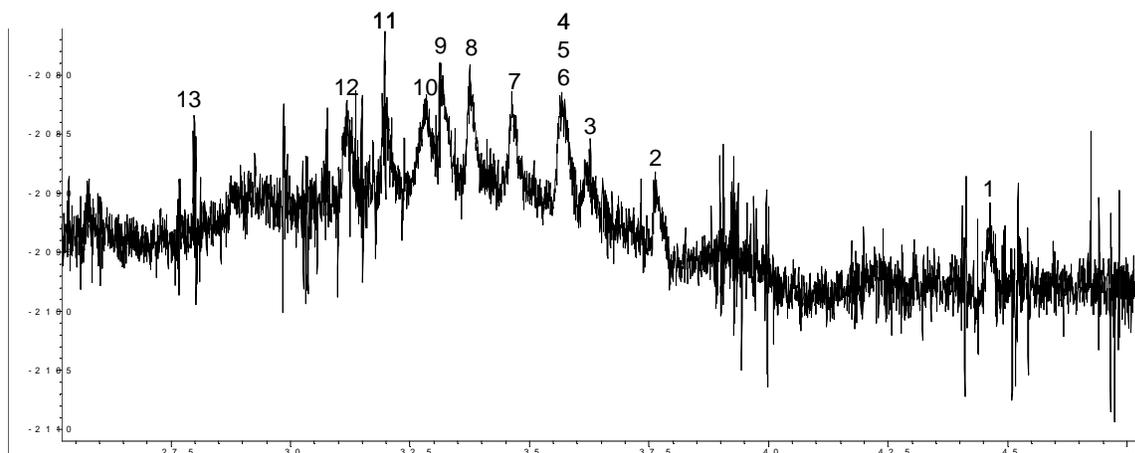


Figura 4: Separação de CHOs com 75 mmol.L<sup>-1</sup> de PDC, 0,5 mmol.L de CTAB, pH 12,25, 20 kV e 25°C, capilar de 50 µm x 112 cm, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Mistura de padrões contendo 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de cada composto. Identificação dos picos igual à Fig. 2.

Com base no resultado do aumento da concentração de PDC, foi possível observar que o aumento da concentração iônica melhorou a separação. Por isso, outros sais também foram avaliados. A adição de tetraborato de sódio ao eletrólito, nas concentrações de 10 e 30 mmol.L<sup>-1</sup>, prejudicou a separação e reduziu o sinal analítico. A adição de fosfato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio (ambos em 10, 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>) melhoraram a separação, mas aumentaram a altura do sinal do ruído e resultaram na falta de reprodutibilidade nos tempos de migração (obtendo CV acima de 8%, n=5).

Em relação à concentração de citrimida, foi possível observar que em 2 mmol.L<sup>-1</sup> o grupo arabinose, manose e frutose apresentou melhor resolução, já o grupo lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose apresentou coeluição completa. Além disso, com o aumento da concentração de citrimida acima de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> as corridas não apresentaram boa reprodutibilidade, sendo observada excessiva variação dos tempos de migração, áreas e posição dos picos.

A adição de solventes orgânicos como etanol, metanol e acetonitrila não contribuíram para melhorar a separação. A substituição do PDC por 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, estudado por Jager, Tavares e Tonin [22], proporcionou melhor estabilidade entre as corridas e reduziu a altura do ruído.

A partir dos resultados obtidos, foi observado que o aumento do pH melhorou a separação, o aumento da concentração do eletrólito e da citrimida também foram eficazes, no entanto, o uso dos níveis máximos testados levaram à

dificuldade em reproduzir os experimentos e identificar os compostos. A melhor condição obtida através desses estudos univariados foi a obtenção de 9 picos, apresentados na Figura 5.

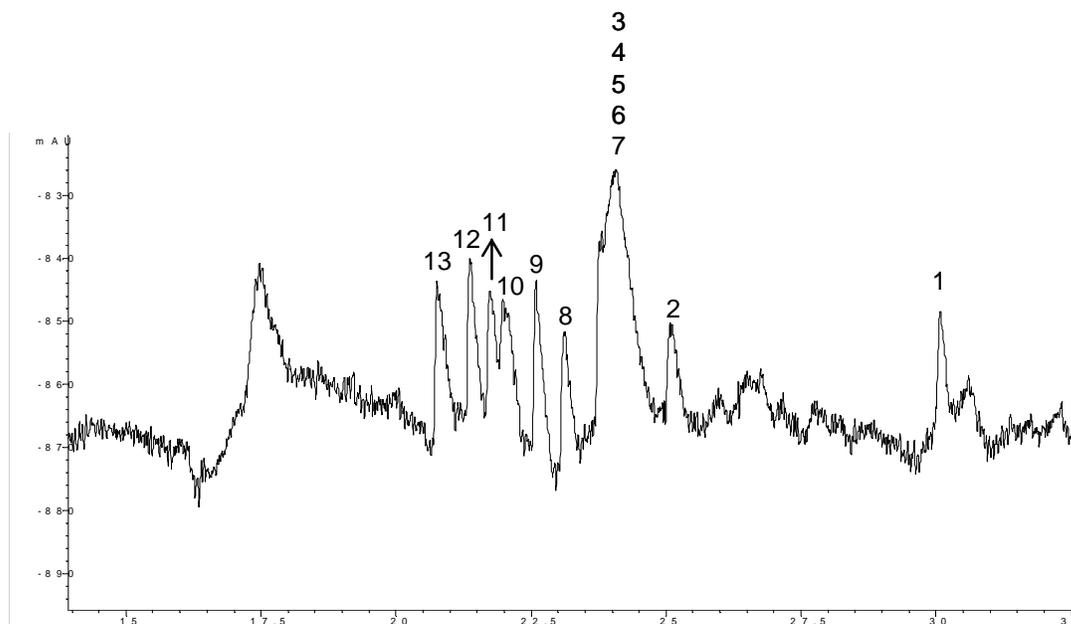


Figura 5: Separação de CHO's com  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de PDC,  $0,5 \text{ mmol.L}$  de CTAB, pH 12,5, 25 kV e  $25^{\circ}\text{C}$ , capilar de  $50 \mu\text{m} \times 112 \text{ cm}$ , injeção de 50 mbar durante 5 s e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Mistura de padrões contendo  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Identificação dos picos igual à Fig. 2.

No entanto, com base nos estudos univariados, não foi possível observar os efeitos de interação entre os fatores mais relevantes o que indica a possível supressão de algumas informações que poderiam ter sido importantes para obter

a separação de mais compostos. O estudo indicou que seria importante uma avaliação mais detalhada dos efeitos do pH, concentração de ácido sórbico e da citrimida, bem como dos efeitos de interação, ao passo que as outras variáveis estudadas se apresentaram ineficientes para o aumento da separação ou para a estabilidade química do sistema, aspecto esse muito importante para a obtenção de métodos repetitivos e com confiabilidade analítica.

### **3.3 MEKC: Uso de Surfactante Aniônico**

Para iniciar os experimentos, foi reproduzida a mesma condição utilizada nos ensaios de seleção de variáveis do modo catiônico, com a diferença da substituição da citrimida por dodecilsulfato de sódio (SDS) em dois níveis, 30 e 60 mmol.L<sup>-1</sup>. Com a adição de 60 mmol.L<sup>-1</sup> de SDS, 20 mmol.L<sup>-1</sup> de PDC, pH 12,25, 25 kV e capilar de 112 cm foi obtida a separação de 9 compostos enquanto a mesma condição com citrimida separou somente 4. Além disso, a condição apresentou boa repetibilidade entre as corridas. A mesma condição foi injetada com ácido sórbico como eletrólito e não foi observada diferença na separação. No entanto, a condição com ácido sórbico apresentou uma linha de base com menos ruído. Por isso, os experimentos a seguir foram realizados com ácido sórbico. Tendo em vista esses resultados, foi realizado um estudo mais detalhado para otimizar as condições de análise com esse modo de separação. A primeira etapa foi avaliar o efeito da concentração de SDS, apresentado na Figura 6.

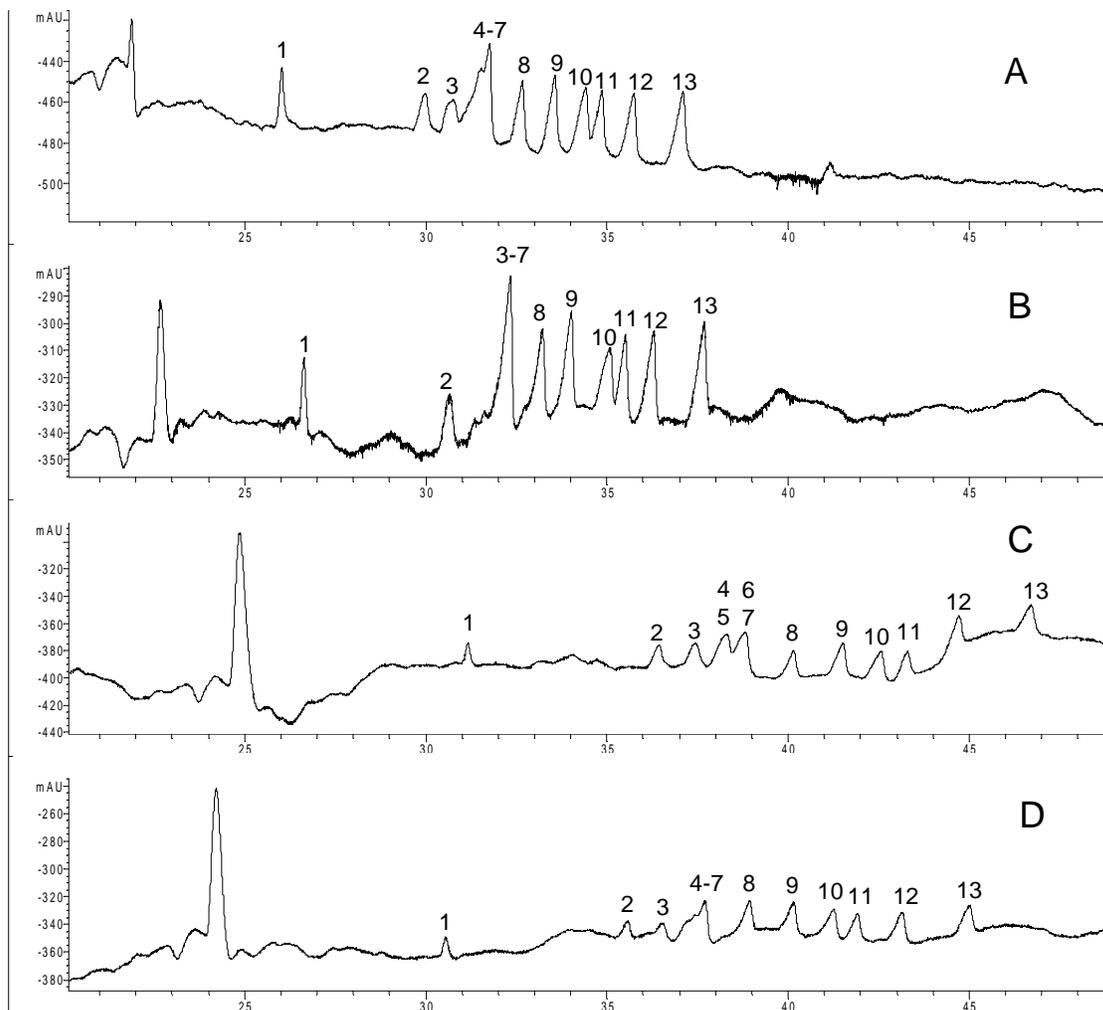


Figura 6: Separação de CHOs com eletrólito contendo  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido sórbico adicionado de SDS nas concentrações de 0 (A), 30 (B), 60 (C) e 90 (D)  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 12,25, 20 kV e  $25^\circ\text{C}$ , capilar de  $50 \mu\text{m} \times 112 \text{ cm}$ , injeção de 50 mbar durante 5 s e detecção indireta em 350 nm (referência em 275). Mistura de padrões contendo  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Identificação dos picos igual à Figura 2.

O aumento da concentração de SDS proporcionou a melhora da separação, ao mesmo tempo em que aumentou o tempo de análise e reduziu a altura do sinal analítico (principalmente nos níveis acima de 30 mmol.L<sup>-1</sup>). No ensaio utilizando 90 mmol.L<sup>-1</sup> não foi observado o aumento da eficiência de separação. Nos experimentos utilizando mais de 90 mmol.L<sup>-1</sup> não foi possível identificar os picos devido a redução da altura do sinal analítico aliada ao aumento do sinal do ruído.

Em seguida foi realizado um estudo da variação do pH utilizando a condição de 60 mmol.L<sup>-1</sup> de SDS e 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sórbico. O pH foi avaliado entre 7,0 e 12,9. Somente a partir do pH 12,1 observou-se o início da separação dos picos. No pH 12,3 apenas 9 compostos foram separados. Em pH 12,7 foi observada a separação de 11 compostos, com a coeluição completa entre arabinose e manose. Nessa condição, também foi verificada a redução da altura do sinal analítico. Em pH 12,9 o ruído ficou muito alto e a dispersão dos picos também aumentou. As melhores condições obtidas com o uso do SDS, em pH 12,7, estão apresentadas na Figura 7.

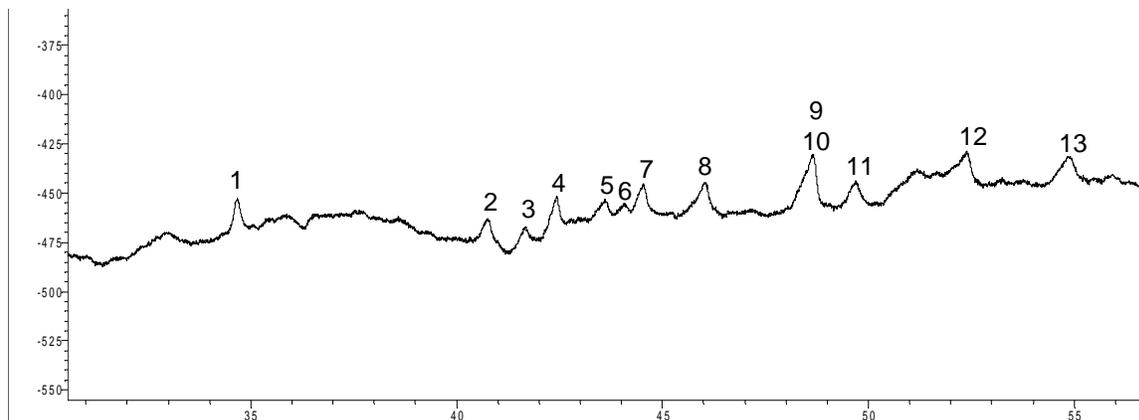


Figura 7: Separação de CHOs com eletrólito contendo 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sórbico adicionado de 60 mmol.L<sup>-1</sup> de SDS, pH 12,7, 20 kV e 25°C, capilar de 50 µm x 112 cm, injeção de 50 mbar durante 5 s e detecção indireta em 350 nm (referência em 275 nm). Mistura de padrões contendo 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de cada composto. Identificação dos picos igual à Figura 2.

Foi possível observar que o SDS, apesar de estar presente em um meio altamente alcalino (acima de 12,0), onde a maioria dos CHOs analisados possui carga, ainda apresentou efeito de interação com os compostos, provavelmente, devido a ionização parcial dos CHOs e dos efeitos de interação superficial com as micelas ou até, de repulsão com as mesmas.

Além disso, o modo de separação micelar com uso de surfactante micelar aniônico mostrou boa repetibilidade quanto à variação dos tempos de migração

(CV menor que 1,0%, n=10), o que diante do método com uso de surfactante catiônico é uma vantagem considerável.

Novamente foi possível observar que o modo de separação em estudo apresenta alguns efeitos de interação, principalmente entre pH, concentração de SDS e ácido sórbico, que não foi possível mensurar nem potencializar no estudo univariado, indicando a necessidade de utilizar ferramentas de otimização mais apuradas, como os modelos estatísticos multivariados.

#### **4 CONCLUSÃO**

O método de eletroforese capilar de zona se mostrou eficiente na separação de 8 compostos (sacarose, lactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose) dentre os 13 estudados. Apresentou-se como uma boa alternativa para a análise dos carboidratos possivelmente presentes em amostras como suco, vinho, arroz e café ou outras que não necessitem da separação de lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose.

Nos métodos micelares estudados, as variáveis pH, concentração do eletrólito e concentração do surfactante (catiônico ou aniônico) mostraram efeitos analiticamente interessantes. O uso de MEKC com surfactante catiônico apresentou a separação dos mesmos compostos que o método por eletroforese

capilar de zona. No entanto, foi observado maior dificuldade para a estabilização do sistema e menor repetibilidade entre as corridas.

O uso de MEKC com surfactante aniônico apresentou a separação de 11 dentre os 13 carboidratos estudados, sendo observada a coeluição somente entre arabinose e manose. O método se mostrou de fácil aplicação e com estabilidade semelhante ao por eletroforese capilar de zona.

Os estudos univariados foram importantes para indicar as variáveis e os níveis destas que merecem maiores avaliações. No entanto, estudos multivariados se fazem necessários no sentido de contribuir para a avaliação dos efeitos de interação que ocorrem entre as variáveis e proporcionar a melhor separação dos compostos, bem como o maior sinal analítico possível.

## **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

[1] FARIAS, F. F.; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, v.8, 2004.

[2] FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, a. 6, 2006.

- [3] CASTRO, A. G.P. de; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, 2002.
- [4] BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. *Introdução à química de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1989.
- [5] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, v. 681, p. 87-97, 1996.
- [6] COLLINS, C. H. *Introdução a métodos cromatográficos*. 6ª ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.
- [7] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. *Journal of Chromatography A*, v. 1150, p. 312–319, 2007.
- [8] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 716, p.231-240, 1995.
- [9] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p 56-64, 2003.
- [10] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.

[11] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p. 99-105, 2007.

[12] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 20, p. 493-511, 1997.

[13] MORALES, G-C.; SIMONET, B. M.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. On-capillary sample cleanup method for the electrophoretic determination of carbohydrates in juice samples. *Electrophoresis*, v. 28, p.1557–1563, 2007.

[14] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.

[15] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, .M. C.; HILDER, E. F. MACKA, M.; HADDAD, P. R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v. 27, p. 4039–4046, 2006.

[16] CAO, Y.; WANG, Y.; CHEN, X., JIANNONG, Y. Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 86, p.131–136, 2004.

[17] ZHANG, X.; CAO, Y.; YE, J. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 72, p. 385-388, 2001.

[18] HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L., FANG, Y. Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Analyst*, v. 126, p. 298-301, 2001.

[19] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 69, p. 339-344, 2000.

[20] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* v. 261, p. 73–78, 1998.

[21] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 243-251, 1997.

[22] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 586-594, 2007.

[23] BAO, Y.; NEWBURG, D. S; ZHU, L. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from Human Milk by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 370, p. 206–214, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

### **OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SEPARAÇÃO DE 13 CARBOIDRATOS PRESENTES EM ALIMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR COM FLUXO INVERSO**

**Adriana D. Meinhart, Cristiano A. Ballus, Roy E. Bruns, Helena T. Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SEPARAÇÃO DE 13 CARBOIDRATOS  
PRESENTES EM ALIMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR COM FLUXO  
INVERSO**

Adriana D. Meinhart<sup>a</sup>, Cristiano A. Ballus<sup>a</sup>, Roy E. Bruns<sup>b</sup>, Helena T. Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil*

<sup>b</sup> *Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

## **RESUMO**

O controle rigoroso da composição de carboidratos em alimentos é fundamental na indústria alimentícia. Existem diversos métodos na literatura, mas poucos estudos se dedicaram a pesquisar a separação simultânea dos carboidratos mais encontrados em alimentos como a glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. Nesse trabalho foi realizado um planejamento composto central para estudar o potencial de separação dos 13 CHOs utilizando eletroforese capilar com inversão do fluxo eletrosmótico. Foram investigados os efeitos do pH, concentração do eletrólito e do tensoativo catiônico, utilizando a resolução entre os compostos como resposta. Nos níveis estudados foi observado que a maioria

das resoluções não foram influenciadas significativamente pelas variáveis. Em exceção, os pares EPI-LTU e LTU-LAC que apresentaram aumento da separação. Além disso, dentre os experimentos realizados no planejamento fatorial, somente foi observado repetibilidade satisfatória dos tempos de migração (com coeficiente de variação de tempo menor que 2%) nos experimentos onde as variáveis estiveram nos menores níveis, que são exatamente as condições onde a maioria dos compostos não foram separados. O sistema estudado permitiu a separação dos CHOs possivelmente presentes em sucos (glicose, frutose e sacarose), vinho (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose) e outras matrizes que tenham esses conjuntos em sua composição. Não foi observada a separação simultânea dos CHOs já encontrados em cereais e lácteos (lactose, lactulose, epilactose, galactose, maltose e maltotriose) e dos CHOs presentes em café (sacarose, galactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose).

## **ABSTRACT**

The strict control of carbohydrate composition in foods is fundamental for the food industry. There are several methods in literature, but few studies were dedicated to assay for the simultaneous separation of the carbohydrates most commonly found in foods, like glucose, fructose, sucrose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, mannose, maltose, xylose, ribose and maltotriose. In this work, a central composite design was executed to study the possibility of separating 13 carbohydrates using capillary electrophoresis with electrosmotic flow inversion.

The effects of pH, electrolyte concentration and cationic surfactant concentration were investigated, using the resolution among the compounds as responses. In the studied levels, it was observed that most of the resolutions were not significantly influenced by the variables. As exceptions, the pairs EPI-LTU and LTU-LAC presented improvement in their separations. Moreover, considering the experiments of the factorial design, satisfactory repeatability of migration times (relative standard deviation lower than 2%) was observed only in the experiments with the lower variable levels, exactly the conditions for which most of the compounds were not separated. The systems studied were capable of separating the carbohydrates present in juices (glucose, fructose and sucrose), wine (sucrose, galactose, glucose, arabinose, fructose, xylose and ribose) and other matrices that had these groups in their compositions. The simultaneous separations of carbohydrates already found in cereals and dairy products (lactose, lactulose, epilactose, galactose, maltose and maltotriose) and the carbohydrates present in coffee (sucrose, galactose, glucose, arabinose, mannose, fructose, xylose and ribose) were not observed.

## 1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos (CHOs) contribuem com 40 a 50% da ingestão calórica do ser humano [1]. A composição de CHOs nos alimentos tem sido observada com maior frequência pelos consumidores devido ao aumento de quadros clínicos como a obesidade, diagnosticada em 40% da população brasileira adulta em 2004

[2]; o diabetes, em 7,6% da população urbana [3]; e o aumento dos casos de intolerância à lactose, sacarose e sacarose-isomaltose em crianças e adultos.

Do ponto de vista industrial, o controle da composição dos CHOs é importante por razões tecnológicas, pois esses compostos contribuem decisivamente para a obtenção das características do produto final, tais como, a cor, o aroma e a textura dos alimentos. Também estão relacionados com o controle de qualidade, pois interferem na conservação dos produtos (como, por exemplo, em geléias, frutas cristalizadas, sucos concentrados, vinhos, doces e outros). Em alguns alimentos, como produtos fermentados, são imprescindíveis para que ocorram as reações necessárias para a obtenção do produto final.

Os CHOs podem ser definidos como poli-hidroxiáldeídos, poli-hidroxicetonas, poli-hidroxiálcoois, poli-hidroxiácidos e seus derivados simples, e polímeros desses compostos unidos por ligações hemiacetálicas [4]. São compostos neutros ou ligeiramente ácidos, existindo na forma aniônica somente em pH acima de 11,5. Possuem massas moleculares e características estruturais muito semelhantes e não absorvem a radiação na região do UV [5-7]. Essas propriedades dificultam a separação e detecção dos CHOs.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que se apresenta como uma boa alternativa para análise de CHOs. Possui uma instrumentação simples, proporciona uma separação de alta eficiência (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), boa resolução e seletividade. As análises são econômicas, rápidas, requerem baixo consumo de reagentes (mL) e geram baixos volumes de resíduos.

Além disso, na maioria dos casos, os resíduos gerados podem ser descartados sem tratamento. Por isso, esta técnica vem sendo alvo de estudos para CHOs e vários outros compostos [5,8-11].

Diversos métodos já foram estudados para a separação de CHOs por eletroforese capilar [12-23]. Dentre os modos de separação já estudados destacam-se a eletroforese capilar de zona e a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), com uso de surfactante/tensoativo catiônico ou aniônico.

A MEKC com uso de tensoativos catiônicos no eletrólito se destaca devido a possibilidade da redução do tempo de corrida. Neste modo de separação, os tensoativos catiônicos como, por exemplo, os sais de amônio [12] geram uma manipulação da carga superficial do capilar ou uma desativação dinâmica que decorre da adsorção física, obtendo como resultado a supressão ou inversão do fluxo eletrosmótico. Nesse caso, os CHOs migram em direção ao ânodo, na mesma direção do fluxo eletrosmótico. Quando não utilizado o tensoativo catiônico, os CHOs ionizados negativamente tendem a migrar no sentido contrário ao fluxo, tornando a análise mais lenta. Nas Figuras 1A e 1B estão ilustrados os dois modos de separação.

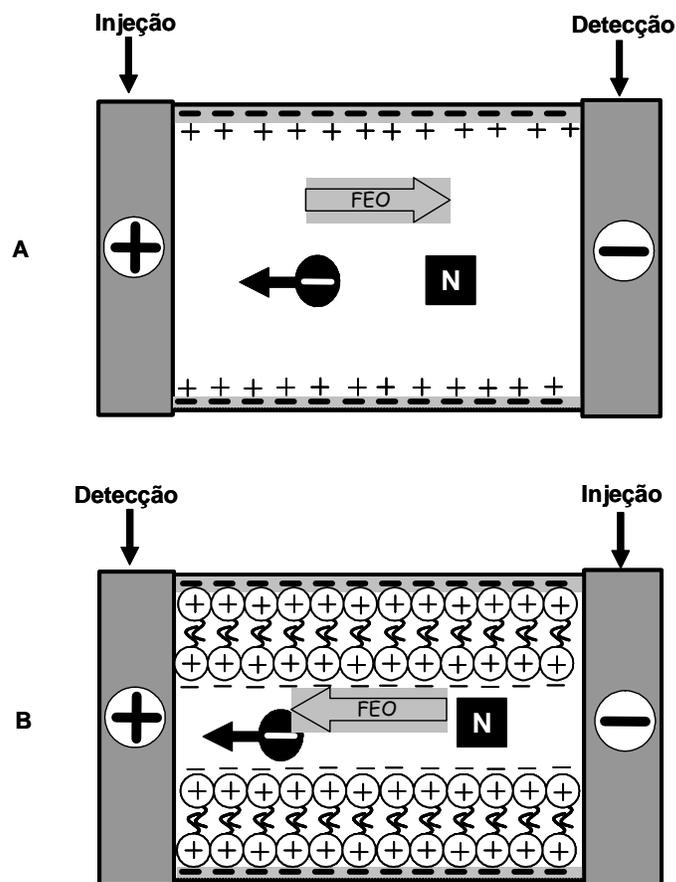


Figura 1: Representação esquemática da migração de analitos neutros e aniônicos através de eletroforese capilar de zona (A) e MEKC com tensoativo catiônico (B). FEO: Fluxoeletrosmótico; N: Composto neutro; ⊖ Composto carregado negativamente.

Utilizando MEKC com tensoativo catiônico, Serwe e Tomoyoshi [19] desenvolveram um método com solução tampão de ácido 2,6-piridino-dicarboxílico e hidróxido de cetil-trimetil-amônio (CTAH), em pH 12,1, com detecção em UV à

275 nm. Sistemas semelhantes foram utilizados em amostras de glicoproteínas [20], e ouriço do mar [13] apresentando bons resultados. Zemmann [21], utilizou uma solução tampão de sorbato de sódio e brometo de hexadimetrina, em pH 12,2, com detecção em 254 nm e 7,5 cm de comprimento de capilar efetivo. Foi possível a separação de manose, glicose, galactose e rafinose em 1 minuto. Recentemente, foi publicado um trabalho [22] com o estudo da separação de CHOs por EC. Os pesquisadores desenvolveram dois métodos, o primeiro para separação de frutose, glicose, maltose, maltotriose, lactose e sacarose, e o segundo, para separação de frutose, glicose, galactose, lactose e sacarose. Os sistemas tampão utilizados foram sorbato, NaOH e brometo de cetil-trimetil-amônio. A diferença entre os dois métodos foi o pH e a concentração do tensoativo. Ambos apresentaram boa resolução, linearidade e sensibilidade.

A partir dos resultados obtidos nos estudos de Meinhart et al. [24] para esse mesmo conjunto de analitos foi observado que, nos sistemas utilizando MEKC com surfactante catiônico, o aumento do pH melhorou a separação, o aumento da concentração do eletrólito e da citrimida também foram eficazes. No entanto, o uso dessas variáveis em níveis elevados ocasionou a falta de reprodutibilidade das análises.

Apesar dos diversos métodos já apresentados na literatura, não foram encontrados estudos da separação simultânea dos 13 CHOs mais encontrados em alimentos. Além disso, dentre os métodos já pesquisados e mencionados na introdução desse trabalho, os estudos de otimização foram realizados de forma

univariada, o que pode suprimir informações a respeito dos efeitos de interação entre as variáveis. Este trabalho apresenta a otimização multivariada da separação de glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose, utilizando eletroforese capilar com inversão do fluxo eletrosmótico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes e soluções**

Os padrões de sacarose (SAC), D-lactose (LAC), lactulose (LTU), epilactose (EPI), maltotriose (MTO), D-(+)-maltose (MAL), D-(+)-glicose (GLI), D-(-)-arabinose (ARA), D-(+)-manose (MAN), D-(-)-frutose (FRU) e D-(-)-ribose (RIB) foram obtidos da Sigma Chemical - EUA. D-(+)-galactose (GAL) e D-xilose (XIL) foram obtidos da Chem Service - EUA. Hidróxido de sódio foi obtido da Nuclear, ácido sórbico e brometo de hexadecil trimetilamônio (citrimida) da Sigma – EUA. Todos os reagentes utilizados possuem elevada pureza analítica. A água ultrapura foi obtida do sistema Milli-Q Direct - Q3 UV (Millipore Corporation, France). Todas as soluções foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultrasons LTDA, Brasil) antes da injeção.

## 2.2 Instrumentação

Os experimentos foram executados usando um equipamento de eletroforese capilar Agilent G1600AX com um detector de arranjo de diodos. Todos os experimentos multivariados foram executados utilizando um capilar de sílica fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 80 cm de comprimento total (72,5 de comprimento efetivo), com bulbo estendido, adquirido da Agilent (Alemanha). As condições de temperatura, voltagem e injeção foram mantidas fixas em 25°C, 20 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 5 s e detecção indireta em 350 (10) nm com referência em 275 (10) nm.

A confirmação dos picos foi realizada mediante adição de padrão para cada um dos compostos em estudo.

## 2.3 Metodologia de Otimização Multivariada

Com a finalidade de otimizar a separação dos 13 compostos simultaneamente, foi utilizado um planejamento composto central multivariado com pontos centrais e axiais. A influência do pH, concentração de citrimida e de ácido sórbico foram investigados, bem como as interações entre as variáveis. Os experimentos foram realizados através da injeção de uma solução padrão contendo a mistura dos 13 compostos. Os picos foram identificados através da fortificação da mistura de padrões com cada um dos compostos.

As variáveis e níveis estudados no planejamento composto central estão apresentados na tabela 1. Para a medida do erro experimental, o ponto central foi realizado em triplicata. Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 1: Variáveis e Níveis do Planejamento Composto Central

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	12,43	12,5	12,6	12,7	12,77
Citrimida (mmol.L <sup>-1</sup> )	0,08	0,25	0,5	0,75	0,92
Ácido Sórbico (mmol.L <sup>-1</sup> )	6,6	10	15	20	23,4

As respostas estudadas foram as resoluções entre os picos adjacentes, calculadas segundo a equação:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

onde  $R_s$  = resolução,  $t$  = tempo de migração e  $W$  = largura do pico.

O tratamento dos dados foi feito através do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA, 95% de confiança).

## 2.4 Procedimentos de análise

Antes do estudo analítico de cada condição do planejamento fatorial, o capilar foi condicionado por lavagem sob pressão de 1000 mbar com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de 5 minutos de lavagem com água purificada e de 10 minutos com o eletrólito de corrida. Para evitar adsorção de solutos no capilar, entre as replicatas de injeção, o capilar foi lavado com eletrólito de corrida durante 2 minutos. Todos os eletrólitos foram filtrados em membrana celulósica de 0,45 µm de porosidade e sonicados durante 5 minutos para a remoção de bolhas de ar.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os experimentos do planejamento composto central os CHOs eluíram na mesma ordem: ribose, xilose, frutose, manose, arabinose, glicose, galactose, maltose, maltotriose, epilactose, lactulose, lactose e sacarose. Na tabela 2, estão apresentadas as respostas investigadas. A partir das resoluções obtidas, pode-se observar que vários compostos apresentaram dificuldade para obter separação. As resoluções denominadas como zero indicam que ocorreu coeluição de tal forma que foi impossível distinguir a natureza dos compostos. Em vários experimentos isso foi observado. Para o conjunto galactose, maltose, maltotriose, epilactose e lactulose a coeluição foi observada na maioria dos experimentos.

As resoluções foram analisadas estatisticamente com a finalidade de plotar modelos lineares ou quadráticos que representassem os dados e pudessem ser utilizados para realizar previsões. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Os modelos que não apresentaram falta de ajuste e que apresentaram a regressão significativa foram para o par EPI-LTU, modelo linear e para o par LTU-LAC, modelo quadrático.

Tabela 2: Resoluções entre os picos adjacentes obtidas no planejamento experimental

Variáveis e Níveis Decodificados			Resoluções entre os picos adjacentes											
pH	Citrimida (mmol.L <sup>-1</sup> )	Ac. Sórbito (mmol.L <sup>-1</sup> )	RIB-	XIL-	FRU-	MAN-	ARA-	GLI-	GAL-	MAL-	MTO-	EPI-	LTU-	LAC-
			XIL	FRU	MAN	ARA	GLI	GAL	MAL	MTO	EPI	LTU	LAC	SAC
12,5	0,25	10	2,4	1,8	0,7	2,0	1,7	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	12,3
12,5	0,25	20	3,6	2,0	0,8	4,3	2,1	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	22,5
12,5	0,75	10	2,9	1,4	0,6	3,5	1,6	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	13,6
12,5	0,75	20	3,2	2,3	1,2	2,3	2,5	1,8	0,0	0,0	0,0	1,5	1,9	18,9
12,7	0,25	10	1,7	2,9	1,4	0,0	3,2	1,9	0,0	0,0	5,1	0,0	3,0	12,6
12,7	0,25	20	2,8	3,0	1,5	0,0	3,5	2,1	0,0	1,3	2,0	1,7	1,9	19,2
12,7	0,75	10	3,2	1,9	1,4	0,0	2,8	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	11,9
12,7	0,75	20	2,3	3,1	1,2	3,4	0,0	1,9	0,0	0,0	1,4	2,0	4,2	18,1
12,6	0,5	15	2,7	2,6	1,7	1,0	2,7	1,8	0,0	0,0	0,0	2,3	4,3	16,1
12,6	0,5	15	2,8	2,7	1,3	0,9	3,6	1,7	0,0	0,0	0,0	2,4	4,2	11,9
12,6	0,5	15	2,8	2,5	1,5	1,4	2,7	2,1	0,0	0,0	0,0	1,8	5,2	14,9
12,43	0,5	15	3,1	1,4	0,0	0,7	3,2	1,5	0,0	0,0	0,0	1,7	2,3	12,6
12,77	0,5	15	2,2	0,7	0,0	2,9	0,8	2,0	0,0	0,0	0,0	2,2	2,7	29,5
12,6	0,08	15	3,2	1,0	0,0	3,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	17,2
12,6	0,92	15	2,6	2,6	1,6	1,3	2,5	0,0	0,0	1,8	2,1	2,9	3,7	20,1
12,6	0,5	6,6	2,4	2,1	0,9	1,6	2,6	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	12,6
12,6	0,5	23,4	2,7	2,9	1,9	1,4	3,0	1,7	0,0	0,0	0,0	3,2	2,1	18,8

RIB: Ribose, XIL: Xilose, FRU: Frutose, MAN: Manose, ARA: Arabinose, GLI: Glicose, GAL: Galactose, MAL: Maltose, MTO: Maltotriose, EPI: Epilactose, LTU: Lactulose, LAC: Lactose e SAC: Sacarose.

Tabela 3: Validação dos Modelos Matemáticos

Resoluções Estudadas	Modelo	Coeficientes (erros)*										Significância Regressão (p<0,05)	Ajuste Modelo (p>0,05)
		Intercepto	A-pH	B-CIT	C-SOR	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	AB	AC	BC		
RIB-XIL	Quadrático	2,73 (0,16)	-0,25 (0,07)	0,01 (0,07)	0,17 (0,07)	-0,02 (0,08)	0,07 (0,08)	-0,05 (0,08)	0,11 (0,10)	-0,17 (0,10)	-0,37 (0,10)	0,0337	0,0356
XIL-FRU	Quadrático	2,55 (0,41)	0,18 (0,19)	0,10 (0,19)	0,27 (0,19)	-0,41 (0,21)	-0,15 (0,21)	0,09 (0,21)	-0,10 (0,25)	0,02 (0,25)	0,23 (0,25)	0,5088	0,0055
FRU-MAN	Quadrático	1,49 (0,29)	0,15 (0,14)	0,20 (0,14)	0,17 (0,14)	-0,45 (0,15)	-0,16 (0,15)	0,05 (0,15)	-0,07 (0,18)	-0,09 (0,18)	0,05 (0,18)	0,2176	0,1075
MAN-ARA	Quadrático	1,10 (0,97)	-0,36 (0,46)	0,01 (0,46)	0,31 (0,46)	0,25 (0,50)	0,39 (0,50)	0,14 (0,50)	0,47 (0,60)	0,28 (0,60)	-0,01 (0,60)	0,9550	0,0137
ARA-GLI	Quadrático	2,95 (0,68)	-0,18 (0,32)	0,04 (0,32)	-0,04 (0,32)	-0,30 (0,35)	-0,56 (0,35)	-0,02 (0,35)	-0,51 (0,42)	-0,48 (0,42)	-0,33 (0,42)	0,6598	0,1303
GLI-GAL	Quadrático	1,85 (0,28)	0,07 (0,13)	-0,23 (0,13)	0,14 (0,13)	0,07 (0,14)	-0,27 (0,14)	0,00 (0,14)	-0,02 (0,17)	-0,04 (0,17)	-0,07 (0,17)	0,4589	0,1489
GLI-MAL	Quadrático	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,0000	0,0000
MAL-MTO	Quadrático	0,01 (0,32)	0,10 (0,15)	0,13 (0,15)	0,10 (0,15)	-0,04 (0,17)	0,29 (0,17)	-0,04 (0,17)	-0,17 (0,20)	0,17 (0,20)	-0,17 (0,20)	0,5954	-
MTO-EPI	Quadrático	-0,05 (0,81)	0,62 (0,38)	-0,16 (0,38)	-0,13 (0,38)	0,15 (0,42)	0,52 (0,42)	0,15 (0,42)	-0,71 (0,50)	-0,22 (0,50)	0,56 (0,50)	0,5707	-
EPI-LTU	Linear	1,27 (0,21)	0,22 (0,24)	0,49 (0,24)	0,77 (0,24)							0,0139	0,1245
LTU-LAC	Quadrático	4,54 (0,27)	0,31 (0,13)	0,35 (0,13)	-0,29 (0,13)	-0,67 (0,14)	-0,54 (0,14)	-0,60 (0,14)	0,57 (0,17)	-0,01 (0,17)	0,20 (0,17)	0,0079	0,6932
LAC-SAC	Quadrático	14,48 (2,72)	1,67 (1,28)	0,06 (1,28)	2,84 (1,28)	1,81 (1,41)	0,96 (1,41)	-0,09 (1,41)	0,06 (1,67)	-0,36 (1,67)	-0,66 (1,67)	0,5194	0,1414

\* p 0,95, CIT: Citrimida; SOR: Ácido Sórbico, A: pH, B: CIT, C: SOR, RIB: Ribose, XIL: Xilose, FRU: Frutose, MAN: Manose, ARA: Arabinose, GLI: Glicose, GAL: Galactose, MAL: Maltose, MTO: Maltotriose, EPI: Epilactose, LTU: Lactulose, LAC: Lactose e SAC: Sacarose.

Os outros 10 modelos não foram suficientemente apurados para realizar predições a respeito da região ótima de separação, 6 desses apresentaram falta de ajuste ou o ajuste não pode ser estimado por falta de respostas no ponto central (onde a resolução foi zero para todas as replicatas). Dentre os que apresentaram ajuste adequado, a regressão não foi significativa.

Estatisticamente, para realizar predições matemáticas de otimização, somente dois modelos poderiam ser úteis (os modelos para os pares EPI-LTU e LTU-LAC). Com base nesses resultados, os modelos não foram utilizados para realizar predições.

Foram então avaliados os resultados das condições experimentais. Foi possível verificar que todas as variáveis, quando em níveis maiores melhoraram sensivelmente a separação, mas o ponto central foi o que apresentou a melhor relação de separação simultânea dos 13 compostos em 12 minutos de análise (Figura 2). Os compostos 3 a 7 apresentaram a maior dificuldade de separação em todas as condições experimentais. Dentre os compostos 8 a 13, a arabinose (9) apresentou muita variação quanto ao tempo de migração, variando desde a coeluição com a glicose (8) até a coeluição com a manose (10).

Com a mistura de padrões mais diluída, foi possível obter a separação entre os picos 9, 10 e 11 e os picos 3 de 4-7 permitindo a separação completa de sacarose, lactose, lactulose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose. Salientando que entre o pico da lactulose e glicose, há um pico onde coeluem a

epilactose, maltotriose, maltose e galactose. Isso indica que se a amostra contiver mais de um desses CHOs, a quantificação pode ocorrer de forma equivocada.

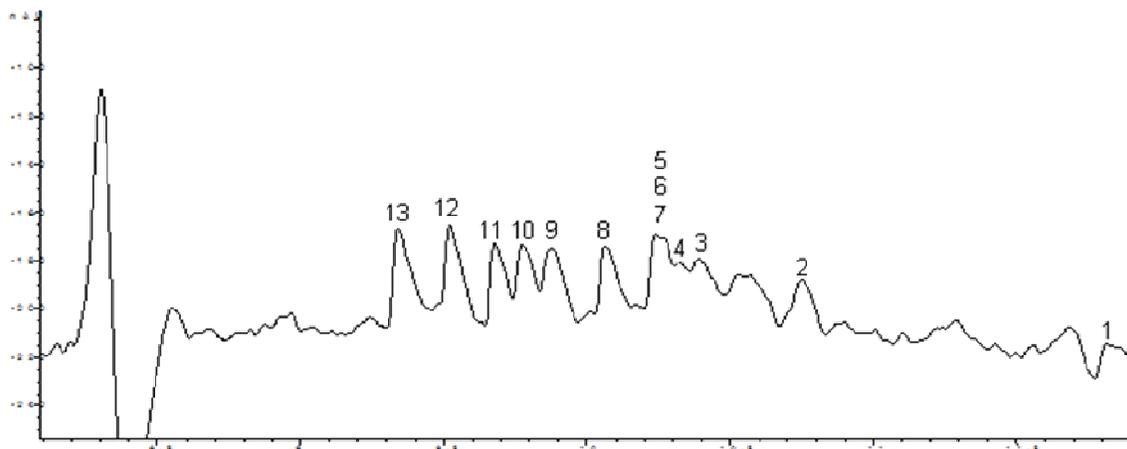


Figura 2: Separação de açúcares com  $15 \text{ mmol.L}^{-1}$  de Ácido Sórbico,  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de CTAB, pH 12,6, 20 kV e  $25^{\circ}\text{C}$ , capilar de  $50 \mu\text{m} \times 80 \text{ cm}$ , injeção de 50 mbar durante 5 s e detecção indireta em 350 (20), ref 275(10). Mistura de padrões contendo  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Identificação dos picos: 1: Sacarose, 2: Lactose, 3: Lactulose, 4: Epilactose, 5: Maltotriose, 6: Maltose, 7: Galactose, 8: Glicose, 9: Arabinose, 10: Manose, 11: Frutose, 12: Xilose, 13: Ribose. Mistura de padrões contendo  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada composto.

Além da separação dos analitos, outro aspecto imprescindível em qualquer método analítico é a estabilidade do sistema. Caso as condições do eletrólito

sejam instáveis, não ocorre a repetibilidade dos tempos de migração e das áreas dos compostos, o que foi observado na maioria dos experimentos. Os fenômenos mais verificados foram a variação dos tempos de migração e a junção de pares de picos a partir da segunda ou terceira corrida.

Esses efeitos poderiam ser decorrentes da hidrólise do eletrólito durante corridas consecutivas já que com a aplicação de elevada voltagem o eletrólito sofre modificações entre as corridas. Essa hipótese foi avaliada nas condições do ponto central através da substituição dos frascos de eletrólito de corrida entre as replicatas, onde foram observados os mesmos resultados. Também foram estudados diferentes condicionamentos entre corridas sendo observado o mesmo efeito. Provavelmente esses resultados são decorrentes da instabilidade do eletrólito quando em composições mais drásticas. Essa possível razão se torna mais plausível quando foi verificado que as condições que menos variaram os tempos de migração foram os experimentos onde o pH e a citrimida estavam nos menores níveis (experimentos: -1,-1,-1; -1,-1,+1). Ainda assim, nesses experimentos foram verificados coeficientes de variação de 1,0 a 8,0% nos tempos de migração.

Esse modo de separação apresentou a vantagem dos baixos tempos de corrida e a desvantagem, nas condições mais drásticas, da elevada instabilidade dos tempos de migração e do perfil de separação. Com isso, foi possível constatar que o modo de separação, nas variáveis e níveis estudados, não foi aplicável para a separação simultânea dos 13 CHOs estudados.

No entanto, mostrou-se útil para análises com menor número de compostos, ou seja, para a separação do conjunto de compostos presentes em uma matriz conhecida. Nesse caso, é importante dedicar atenção especial na escolha das condições de separação para que não ocorram co-eluições dos CHOs presentes, o que levaria a quantificações errôneas.

Supondo uma análise de amostra de suco, onde a matriz possui somente glicose, frutose e sacarose [19], todas as condições experimentais testadas apresentaram separação adequada. Para os carboidratos já encontrados em amostras de cereais e lácteos, nenhuma das condições apresentou separação e estabilidade adequadas.

Para amostras de café, onde já foram encontrados sacarose, galactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose [25,26] as condições aqui estudadas devem ser vistas com cautela pois, na maioria dos casos, ocorreram várias coeluições entre os compostos. Nas condições em que foi observada a separação adequada, estas não apresentaram estabilidade necessária para validação de métodos analíticos. Para amostras de vinho, onde já foram encontrados sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose [27-29], a condição experimental utilizando os menores níveis das três variáveis mostrou-se a mais adequada.

#### 4. CONCLUSÃO

O emprego do planejamento composto central para investigar os efeitos do pH, da concentração de citrimida e do ácido sórbico proporcionou diversas informações importantes para avaliar o sistema de separação em apenas 17 experimentos. A falta de modelos matemáticos com ajuste e/ou com regressões significativas, aliado a instabilidade do sistema nos níveis estudados, impossibilitou a otimização da separação simultânea dos 13 CHOs. No entanto, foi observado que, quando as variáveis foram utilizadas em menores níveis, o sistema tornou-se mais repetitivo, mas nessas regiões não ocorre a separação simultânea dos 13 CHOs. O sistema estudado permitiu a separação dos CHOs possivelmente presentes em sucos (glicose, frutose e sacarose), vinho (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose) e outras matrizes que tenham esses conjuntos em sua composição. Nos níveis estudados, a separação dos CHOs já encontrados em cereais, lácteos e café, por exemplo, não apresentaram separação adequada podendo induzir a quantificações errôneas devido as coeluições.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FARIAS, F. F.; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, v.8, 2004.

[2] FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, a. 6, 2006.

[3] CASTRO, A. G.P. de; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 46, 2002.

[4] BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. Introdução à química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Editora Varela, 1989.

[5] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. Journal of Chromatography B, v. 681, p. 87-97, 1996.

[6] COLLINS, C. H. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª ed. Editora da UNICAMP, Campinas, 1995.

[7] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. Journal of Chromatography A, v. 1150, p. 312–319, 2007.

[8] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. Journal of Chromatography A, v. 716, p.231-240, 1995.

- [9] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p 56-64, 2003.
- [10] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.
- [11] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p. 99-105, 2007.
- [12] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 20, p. 493-511 , 1997.
- [13] MORALES, G-C.; SIMONET; B. M.; CÁRDENAS; S.; VALCÁRCEL, M. On-capillary sample cleanup method for the electrophoretic determination of carbohydrates in juice samples. *Electrophoresis*, v. 28, p. 1557–1563, 2007.
- [14] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.
- [15] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; HILDER, E.F.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v. 27, p. 4039–4046, 2006.

[16] CAO, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; JIANNONG, Y. Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 86, p. 131–136, 2004.

[17] ZHANG, X.; CAO, Y.; YE, J. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 72, p. 385-388, 2001.

[18] HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L., FANG, Y. Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Analyst*, v. 126, p. 298-301, 2001.

[19] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 69, p. 339-344, 2000.

[20] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 261, p. 73–78, 1998.

[21] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 243-251, 1997.

[22] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in

cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 586-594, 2007.

[23] BAO, Y. NEWBURG, D. S; ZHU, L. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from Human Milk by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 370, p. 206–214, 2007.

[24] MEINHART, A. D; BALLUS, C. A.; BRUNS, R. E; GODOY, H.T. Estudo de Três Metodologias na Separação Simultânea de 13 Carboidratos Presentes em alimentos. Capítulo 2 da Tese de Doutorado, UNICAMP, SP, 2010.

[25] MARTINS, M. C. M.; SILVA, C. O.; BUCKERIDGE, M. S.; VIEIRA, C. C. de J. Carboidratos na bebida do café preparado sob diferentes processos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 382-386, 2005.

[26] NOGUEIRA, T.; LAGO, C. L do. Detection of adulterations in processed coffee with cereal and coffee husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 32, p. 3507-3511, 2005.

[27] TRONCHONI, J., GAMERO, A.; LÓPEZ-ARROYO, F., N. ; BARRIO, E., QUEROL, A. Differences in the Glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 237-243, 2009.

[28] GARCIA-MARTÍN, N.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA-HERAS, M.; PÉREZ-MAGARINO, S. GONZÁLES-HUERTA, D. C.;

Evaluation of several ultra- and manofiltration membranes for sugar control in winemaking. *Desalination*, v. 245, p. 554-558, 2009.

[29] KLAMPFL, C.W., BUCHBERGER, W. Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis*, v. 22, p. 2737-2742, 2001.



## **CAPÍTULO 4**

### **OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE SEIS DIFERENTES METODOLOGIAS PARA A SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM ALIMENTOS UTILIZANDO O MÉTODO DE DERRINGER E SUICH NA PREDIÇÃO MATEMÁTICA DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS**

**Adriana D. Meinhart, Cristiano A. Ballus, Roy E. Bruns, Helena T. Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE SEIS DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
A SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM ALIMENTOS UTILIZANDO O  
MÉTODO DE DERRINGER E SUICH NA PREDIÇÃO MATEMÁTICA DAS  
CONDIÇÕES ANALÍTICAS**

Adriana D. Meinhart<sup>a</sup>, Cristiano A. Ballus<sup>a</sup>, Roy E. Bruns<sup>b</sup>, Helena T. Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil*

<sup>b</sup> *Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

**RESUMO**

Os carboidratos (CHOs), presentes na maioria dos alimentos, são compostos de ações biológicas e tecnológicas distintas, mas de características físico-químicas semelhantes e, por isso, de difícil separação. Nesse estudo, foi realizada a otimização da separação de seis diferentes conjuntos de CHOs contendo pares críticos de separação utilizando cromatografia eletrocinética micelar com surfactante aniônico. Para estudar os efeitos do pH, da concentração do eletrólito e do surfactante sobre a separação dos compostos foi utilizado um planejamento composto central envolvendo 17 experimentos. A otimização simultânea das

respostas para a separação dos seis conjuntos de CHOs foi realizada através do método de Derringer e Suich empregando os modelos matemáticos para realizar a predição das condições ótimas de resolução dos seis métodos, aplicados, respectivamente, em leite condensado (lactose, lactulose, epilactose, galactose e glicose), outro para suco de laranja (sacarose, glicose e frutose), o terceiro para farelo de arroz (glicose, arabinose, frutose e xilose), o quarto para vinho tinto (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose), o quinto para café torrado e moído (galactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose) e sexto método para cereais matinais (sacarose, lactose, lactulose, epilactose, maltotriose, maltose, galactose, glicose e frutose). Os métodos foram aplicados em padrões e amostras reais onde foram observados boa separação, sensibilidade e seletividade apropriadas.

## **ABSTRACT**

The carbohydrates (CHOs), present in most foods, are compounds with different biological and technological actions, however, they have similar physico-chemical characteristics and, because of this, they are hard to separate. In this study, a separation optimization of six different CHOs groups containing critical separation pairs was achieved, using micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. To evaluate the effects of pH, electrolyte and surfactant concentration on compound separations, a central composite design involving 17 experiments was employed. The simultaneous response optimization for the separation of six

groups was executed using Derringer and Suich's desirability function, that uses the mathematical models to predict the optimum resolution conditions for the six methods, applied respectively to condensed milk (lactose, lactulose, epilactose, galactose and glucose), orange juice (sucrose, glucose and fructose), rice bran (glucose, arabinose, fructose and xylose), red wine (sucrose, galactose, glucose, arabinose, fructose, xylose and ribose), roasted and ground coffee (galactose, glucose, arabinose, mannose, fructose, xylose and ribose) and breakfast cereals (sucrose, lactose, lactulose, epilactose, maltotriose, maltose, galactose, glucose and fructose). The methods were applied to standards and real samples, and good separation and appropriated sensitivity and selectivity were observed.

## 1. INTRODUÇÃO

A análise de CHOs em alimentos é de extrema importância nutricional já que estes contribuem com 40 a 50% da ingestão calórica do ser humano [1]. O aumento freqüente dos índices de obesidade, diabetes e de intolerâncias intensificam a necessidade do rigoroso controle desses compostos. Na indústria alimentícia, são utilizados como coadjuvantes de tecnologia para a obtenção das características físico-químicas e sensoriais dos alimentos [2, 3], mas também servem como marcadores da qualidade do processamento [4]. O leite, quando submetido a aquecimento excessivo, apresenta a reação de isomerização da lactose formando lactulose e epilactose. Ambas possuem menor valor biológico que a lactose e podem causar reações adversas como flatulências [4-7]. A

presença excessiva de glicose no pó de café após hidrólise indica adulteração do produto por adição de outros grãos [8]. Na palha de arroz, considerada como subproduto da indústria alimentícia, o carboidrato predominante é a xilose, por isso, esse produto tem sido utilizado como fonte para obtenção de xilitol (composto com elevado poder edulcorante) [9]. Já a importância da quantificação de CHOs em vinho está correlacionada com a conservação do produto final. Estudos indicam que as cepas mais utilizadas no processo fermentativo consomem mais a glicose do que a frutose. Logo, a presença excessiva de frutose no vinho pode comprometer a conservação da bebida [10]. Ainda, o controle da composição de CHOs no mosto é fundamental para a padronização do teor alcoólico do vinho [11].

A determinação dos diferentes CHOs é um grande desafio, pois são analitos de difícil separação por apresentarem características físico-químicas semelhantes [12, 13]. Várias técnicas analíticas tem sido estudadas para essa finalidade, dentre elas, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar (CE). A CE é uma técnica em ascensão para este tipo de análise, pois o capilar de sílica fundida resiste a pHs altamente alcalinos, acima de 11,5, permitindo a ionização dos CHOs, o que facilita a separação [14 - 21]. Além disso, a técnica tem sido muito empregada devido aos baixos custos em reagentes e pouca geração de resíduos [14, 22 - 26]. Diversos modos de separação já foram estudados em CE, em destaque estão a eletroforese capilar de zona (CZE), com ou sem reações de derivatização, e a cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) com surfactante catiônico [14 - 21]. Apesar das

diversas pesquisas já desenvolvidas, ainda são verificadas algumas dificuldades na separação de maltose e glicose [14], glicose e galactose [22], galactose, maltose e maltotriose [23], frutose e xilose [24], frutose e manose [8], compostos importantes em algumas matrizes presentes nesse estudo. A MEKC com surfactante aniônico é um modo de separação empregado em diversas análises em alimentos e se baseia na partição dos analitos entre duas fases, a fase micelar e o eletrólito de corrida. A formação de micelas ocorre pela adição de agentes tensoativos ao eletrólito, em concentrações acima da concentração micelar crítica [27]. Bao, Newburg e Zhu [28] observaram bons resultados na separação para oligossacarídeos em leite humano utilizando o tensoativo dodecilsulfato de sódio. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre a separação de CHOs utilizando esse modo de separação.

De forma geral, a otimização de métodos de separação depende de muitas variáveis que interferem diretamente na separação dos compostos, destacando-se o pH, o tipo e concentração do eletrólito, voltagem, o tamanho do capilar e a temperatura [8, 14-18]. As estratégias de otimização multivariadas vem sendo cada vez mais utilizadas para o desenvolvimento de métodos de separação, pois permitem a avaliação dos efeitos de interação entre as variáveis, reduzem o número de experimentos e tornam possível a construção de modelos matemáticos para prever a condição experimental adequada [20, 29]. Por outro lado, a otimização da separação de vários compostos simultaneamente gera muitas respostas que podem indicar regiões ótimas diferentes. O método de Derringer e Suich [30] foi estudado para otimizar simultaneamente várias

respostas, baseando-se em uma função de desejabilidade global que fornece uma resposta única para o sistema. O planejamento composto central [31] e o método de Derringer e Suich foram utilizados recentemente com sucesso na separação de resveratrol em nutracêuticos [32], rizatriptano em fármacos [33], separação de compostos quirais [34] e otimização de ensaios bioquímicos [35].

Neste estudo foi investigado o potencial do modo de separação MEKC com uso de surfactante aniônico sobre a resolução de carboidratos de difícil separação. Para reduzir ao máximo o número de experimentos, o estudo foi realizado através de um planejamento composto central a fim de avaliar o efeito de três variáveis importantes na separação (pH, concentração do eletrólito e do surfactante). Através do método de Derringer e Suich foi realizada a previsão matemática da separação dos analitos de interesse em cada amostra. Foram desenvolvidos e otimizados seis métodos para a separação dos diferentes CHOs presentes em café, farelo de arroz, vinho tinto, cereais, suco de laranja e leite condensado. Os métodos foram aplicados também em amostras reais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Os padrões de sacarose (SAC), D-lactose (LAC), lactulose (LTU), epilactose (EPI), maltotriose (MTO), D-(+)-maltose (MAL), D-(+)-glicose (GLI), D-(-)-arabinose (ARA), D-(+)-manose (MAN), D-(-)-frutose (FRU) e D-(-)-ribose (RIB)

foram obtidos da Sigma Chemical - EUA. D-(+)-galactose (GAL) e D-xilose (XIL) foram obtidos da Chem Service - EUA. Hidróxido de sódio foi obtido da Nuclear, ácido sórbico (SOR) da Sigma – EUA e dodecilsulfato de sódio (SDS) da Riedel-de-Haën (Alemanha). Todos os reagentes utilizados possuem elevada pureza analítica. A água ultrapura foi obtida do sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, France).

As soluções estoque de padrões de CHOs ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram mantidas à  $-18^{\circ}\text{C}$  até o preparo das soluções de trabalho. Todas as soluções de padrões foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) antes da injeção. As amostras de leite condensado, suco de laranja, café torrado e moído, cereais matinais, vinho tinto e farelo de arroz foram adquiridas em supermercados de Campinas, SP.

## 2.2 Instrumentação

Os experimentos foram executados usando um equipamento de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technology, Alemanha) com um detector de arranjo de diodos. Todos os experimentos de otimização multivariada foram executados utilizando um capilar de sílica fundida de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro por 80 cm de comprimento total (72 cm de comprimento efetivo), com bulbo estendido, adquiridos da Agilent, Alemanha. As condições de temperatura, voltagem e injeção foram mantidas fixas em  $25^{\circ}\text{C}$ , 20 kV e injeção hidrodinâmica de 50 mbar

durante 5 s. A detecção foi realizada de forma indireta em 350 (10) nm com referência em 275 (10) nm.

### 2.3 Otimização Multivariada

Os métodos analíticos foram otimizados através da execução de um planejamento composto central, com pontos centrais e axiais [36, 37]. A influência do pH, concentração do eletrólito (SOR) e do surfactante (SDS) foram investigadas, bem como os efeitos de interação entre as variáveis. Com a finalidade de otimizar os seis métodos analíticos executando apenas um planejamento composto central, todos os experimentos foram realizados através da injeção de uma solução padrão contendo uma mistura de todos os compostos a serem separados em todas as matrizes de interesse, totalizando 13 compostos.

Os níveis estudados no planejamento fatorial foram: pH de 12,43 (nível -1,68) até 12,77 (nível +1,68), concentração do SDS de 0 a 75,3 mmol.L<sup>-1</sup> e concentração de SOR de 6,6 a 23,4 mmol.L<sup>-1</sup>. Para a medida do erro experimental, o ponto central foi realizado em triplicata. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

As respostas estudadas foram as resoluções entre os picos adjacentes, de acordo com os analitos presentes em cada matriz, calculadas conforme a equação apresentada a seguir.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

onde  $R_s$  = resolução,  $t$  = tempo de migração e  $W$  = largura do pico.

Para leite condensado foram observadas as resoluções entre LAC-LTU, LTU-EPI, EPI-GAL e GAL-GLI; para sucos de laranja foram observadas as resoluções entre SAC-GLI e GLI-FRU; para farelo de arroz as resoluções entre GLI-ARA, ARA-FRU e FRU-XIL; para vinho as SAC-GAL, GAL-GLI, GLI-ARA, ARA-FRU, FRU-XIL e XIL-RIB; para café GAL-GLI, GLI-ARA, ARA-MAN, MAN-FRU, FRU-XIL e XIL-RIB; e para cereais matinais as resoluções observadas foram SAC-LAC, LAC-LTU, LTU-EPI, EPI-MTO, MTO-MAL, MAL-GAL, GAL-GLI e GLI-FRU. Como respostas adicionais, foram incluídos, como critério de seleção caso houvesse mais de uma resposta, o tempo de corrida e a altura do sinal analítico em relação à altura do sinal do ruído.

O tratamento dos dados foi feito através do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA, 95% de confiança). Foi utilizada a técnica de Derringer e Suich, estipulando-se critérios de desejabilidade para cada resolução. As condições previstas pelos modelos foram confirmadas experimentalmente nos conjuntos de padrões analíticos. As condições ótimas foram aplicadas em amostras para avaliar o efeito das matrizes.

## 2.4 Procedimentos de Análise

Antes do estudo analítico de cada condição do planejamento fatorial, o capilar foi condicionado por lavagem sob pressão de 1000 mbar com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de 5 minutos de lavagem com água purificada e de 10 minutos com o eletrólito de corrida. Para evitar adsorção de solutos no capilar, entre as replicatas de injeção de condição idêntica, o capilar foi lavado com eletrólito de corrida durante 2 minutos. Todos os eletrólitos foram filtrados em membrana celulósica de 0,45 µm de porosidade e centrifugados por 10 minutos a 5000 RPM (Excelsa II, mod. 206 BL, Fanem, Brasil) para remoção de ar dissolvido.

Para análises de rotina em amostras de alimentos, o capilar foi condicionado no início do dia com lavagem sob pressão de 1000 mbar com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de 5 minutos de lavagem com água purificada e de 10 minutos com o eletrólito de corrida. Entre as injeções, o pré-condicionamento foi de 2 minutos de eletrólito. Ao final do dia, o capilar foi lavado com 5 minutos de solução NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e 5 minutos com água ultra-pura, sendo armazenado em água.

## 2.5 Preparo das Amostras

As amostras de suco de laranja e vinho foram diluídas com água deionizada (1:20 e 1:6, respectivamente) [16, 38]. Para o leite condensado, 0,5 g de amostra foi solubilizado em água e elevado ao volume de 25 mL. Em 10 mL da solução, foi

adicionado 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético e centrifugado a 5000 rpm durante 10 min, sendo o sobrenadante coletado para a análise [16]. As amostras de cereais matinais foram trituradas e 5 g foram levados ao ultrassom com 80 mL de água por 5 minutos. O volume foi completado para 100 mL [20]. Para amostras de café torrado e moído, 5 g da amostra adicionados de 50 mL de  $\text{HCl}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e aquecidos em banho-maria a  $90^\circ\text{C}$  durante 150 min (sob agitação). A amostra foi neutralizada com  $\text{NaOH}$  e levada ao volume de 100 mL. O farelo de arroz foi hidrolisado da mesma forma que o café para a extração da xilose [8]. Todos os extratos das amostras foram filtrados em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade e levados ao ultrassom durante 5 minutos antes da injeção no equipamento de eletroforese capilar.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Otimização das Metodologias Analíticas

Na tabela 1 estão apresentados as variáveis e níveis estudados para o conjunto de padrões dos 13 carboidratos, bem como os resultados obtidos para cada par de compostos. Foi possível observar que os três parâmetros investigados apresentaram efeitos significativos na separação dos picos. Os analitos apresentaram, em todos os experimentos, a seguinte ordem de eluição: SAC, LAC, LTU, EPI, MTO, MAL, GAL, GLI, ARA, MAN, FRU, XIL, XIL, RIB. O efeito do aumento do pH foi positivo para a resolução da maioria dos pares, com

exceção dos pares ARA-FRU, ARA-MAN e XIL-RIB, onde foi observado efeito negativo, indicando que o aumento do pH, para níveis maiores que a região experimental, promove a inversão da ordem desses picos.

A adição de SDS ao eletrólito também apresentou efeito positivo para a maioria das resoluções estudadas, com exceção da resolução entre ARA-MAN onde foi observado efeito negativo. O efeito significativo do SDS sobre a separação pode estar correlacionado à associação dos solutos polares à superfície da micela, através de interações do tipo dipolo-dipolo ou íon-dipolo com os grupos polares (ou iônicos) da cabeça do tensoativo. Fortes interações coulômbicas (atrativas e repulsivas) também podem ocorrer quando o soluto apresenta carga, conforme descrito por Tavares [39].

O aumento da concentração de ácido sórbico também apresentou efeitos positivos. No entanto, também foi observado que o aumento das três variáveis individualmente ou de forma simultânea ocasionaram a redução do sinal analítico, aumento do ruído e do tempo de corrida.

A tabela 2 mostra os modelos matemáticos obtidos para o conjunto de dados experimentais, bem como os testes para a falta de ajuste e a significância das regressões obtidos a partir das análises de variância (ANOVA). A partir dos valores de p foi possível observar que a maioria dos modelos matemáticos obtidos apresentou ajuste adequado ( $p > 0,05$ ) às respostas obtidas experimentalmente. Não foi possível avaliar o ajuste dos modelos para as resoluções entre os compostos EPI-MTO e MAL-GAL pois ocorreu coeluição completa nas três

repetições do ponto central. Dessa forma, a resolução foi considerada como zero para os três ensaios, inviabilizando a medida do erro experimental. Quanto à significância das regressões, os valores de  $p$  foram menores que 0,05, indicando que os modelos matemáticos são significativos. Para a resolução entre MAL-GAL o valor de  $p$  foi ligeiramente superior a 0,05. Essa dificuldade pode estar correlacionada à falta de respostas para esse par de compostos já que, dos 17 experimentos realizados, em apenas 3 respostas foram obtidos valores maiores que zero (em todas as outras condições ocorreu coeluição completa).

Através do método de desejabilidades de Derringer e Suich, os modelos foram utilizados para realizar a predição matemática das condições otimizadas de separação. Na tabela 3 estão apresentados os critérios estabelecidos para os modelos, as condições experimentais codificadas previstas pelos mesmos, as respostas de resolução previstas e as respostas obtidas através dos ensaios experimentais dessas condições.

Tabela 1: Níveis das variáveis estudadas e respostas experimentais

Variáveis Decodificadas			Resoluções estudadas para a otimização dos métodos																
pH	SDS <sup>(1)</sup>	SOR <sup>(1)</sup>	SAC- GLI	GLI- FRU	LAC- LTU	LTU- EPI	EPI- GAL	GAL- GLI	GLI- ARA	ARA- FRU	FRU- XIL	SAC- GAL	ARA- MAN	MAN- FRU	XIL- RIB	EPI- MTO	MTO- MAL	MAL- GAL	SAC- LAC
12,5	15,0	10,0	22,8	7,3	2,4	0,0	0,0	1,7	1,8	5,5	1,3	10,7	3,0	0,9	3,2	0,0	0,0	0,0	11,1
12,5	15,0	20,0	29,5	8,6	2,3	0,0	0,0	2,1	1,9	6,3	1,4	12,5	3,3	0,9	4,0	0,0	0,0	0,0	14,0
12,5	60,0	10,0	27,6	7,5	3,3	0,0	0,0	1,5	2,5	5,4	1,6	14,3	2,9	1,0	4,0	0,0	0,0	0,0	16,2
12,5	60,0	20,0	33,1	8,8	2,6	0,0	0,0	1,8	2,6	6,2	1,7	11,8	3,2	1,4	4,6	0,0	0,0	0,0	17,8
12,7	15,0	10,0	19,6	7,0	1,5	0,0	1,6	1,5	3,5	2,4	3,2	11,1	0,7	2,6	3,3	1,6	0,0	0,0	9,7
12,7	15,0	20,0	28,4	7,9	1,5	0,0	2,4	2,6	3,7	4,0	2,9	21,2	2,0	2,2	3,8	1,2	1,3	0,0	13,4
12,7	60,0	10,0	28,5	7,2	2,4	1,2	1,0	2,9	3,3	3,6	2,8	22,7	1,9	2,3	3,4	0,0	1,0	0,0	16,3
12,7	60,0	20,0	33,5	9,3	3,1	2,0	5,4	3,6	5,3	2,6	4,7	30,8	0,0	2,6	4,8	2,6	1,5	1,3	20,1
12,6	37,5	15,0	29,9	8,2	2,1	1,4	0,9	3,1	3,8	4,7	2,8	25,2	2,3	2,1	3,7	0,0	0,9	0,0	13,2
12,6	37,5	15,0	32,8	7,4	2,7	0,7	1,7	2,2	3,7	3,4	3,2	22,4	1,3	2,4	3,8	0,0	1,7	0,0	18,3
12,6	37,5	15,0	29,3	7,7	2,2	1,2	1,3	2,5	3,9	4,1	3,1	22,4	1,9	2,4	4,0	0,0	1,3	0,0	16,3
12,43	37,5	15,0	20,1	7,7	2,8	0,0	1,5	0,0	1,8	8,2	0,9	20,1	5,2	1,1	5,1	0,0	0,0	1,5	16,0
12,77	37,5	15,0	31,5	7,6	2,5	1,7	6,7	2,7	4,3	2,3	4,4	31,0	0,6	2,6	4,1	3,7	0,8	1,5	18,6
12,6	0,0	15,0	24,8	7,0	3,2	0,0	0,0	1,5	2,6	5,0	1,6	12,7	3,1	1,0	3,2	0,0	0,0	0,0	12,1
12,6	75,3	15,0	38,8	9,5	2,6	1,6	1,8	2,9	4,5	3,9	3,6	24,0	1,4	2,7	4,4	0,0	1,8	0,0	22,1
12,6	37,5	6,6	24,5	6,8	2,5	0,0	0,0	1,1	2,1	5,1	1,5	11,0	2,8	0,9	3,4	0,0	0,0	0,0	11,5
12,6	37,5	23,4	42,2	8,7	2,3	2,1	1,5	2,7	4,6	4,6	3,7	25,3	2,4	2,5	4,8	0,0	1,5	0,0	23,5

<sup>(1)</sup> Concentrações em mmol.L<sup>-1</sup>, SDS: dodecil sulfato de sódio, SOR: Ácido Sórbico, RIB: Ribose, XIL: Xilose, FRU: Frutose, MAN: Manose, ARA: Arabinose, GLI: Glicose, GAL: Galactose, MAL: Maltose, MTO: Maltotriose, EPI: Epilactose, LTU: Lactulose, LAC: Lactose e SAC: Sacarose.

Tabela 2: Validação dos Modelos Matemáticos

Resoluções Estudadas	Modelo Indicado	Coeficientes (erro) <sup>(1)</sup>									Significância Regressão (se p<0,05)	Ajuste do Modelo (se p>0,05)	
		Intercepto	A-pH	B-SDS	C-SOR	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	AB	AC			BC
SAC-GLI	Linear	29,23 (0,89)	1,18 (0,99)	3,36 (0,99)	4,09 (0,99)							0,0011	0,1993
GLI-FRU	Linear	7,89 (0,10)	-0,08 (0,11)	0,46 (0,11)	0,65 (0,11)							<0,0001	0,6231
LAC-LTU	Média	2,47 (0,12)										-	0,3339
LTU-EPI	Linear	0,71 (0,14)	0,45 (0,16)	0,44 (0,16)	0,31 (0,16)							0,0056	0,2434
EPI-GAL	Linear	1,51 (0,33)	1,40 (0,37)	0,39 (0,37)	0,56 (0,37)							0,0089	0,0682
GAL-GLI	Linear	2,14 (0,14)	0,58 (0,16)	0,31 (0,16)	0,37 (0,16)							0,0035	0,4436
GLI-ARA	Linear	3,28 (0,13)	0,82 (0,14)	0,46 (0,14)	0,49 (0,14)							<0,0001	0,0528
ARA-FRU	Linear	4,55 (0,16)	-1,52 (0,18)	-0,15 (0,18)	0,09 (0,18)							<0,0001	0,5628
FRU-XIL	Linear	2,61 (0,12)	0,99 (0,14)	0,40 (0,14)	0,40 (0,14)							<0,0001	0,0943
SAC-GAL	Quadrático	23,59 (1,80)	4,01 (0,85)	3,16 (0,85)	3,05 (0,85)	-0,03 (0,93)	-2,58 (0,93)	-2,66 (0,93)	2,30 (1,10)	2,35 (1,10)	- (1,10)	0,0058	0,1765
ARA-MAN	Linear	2,24 (0,16)	-1,16 (0,18)	-0,28 (0,18)	-0,06 (0,18)							0,0002	0,3402
MAN-FRU	Linear	1,85 (0,11)	0,59 (0,12)	0,27 (0,12)	0,21 (0,12)							0,0007	0,1304
XIL-RIB	Linear	3,98 (0,08)	-0,15 (0,09)	0,32 (0,09)	0,41 (0,09)							0,0005	0,1254
EPI-MTO	Quadrático	0,00 (0,31)	0,85 (0,14)	-0,01 (0,14)	0,16 (0,14)	0,66 (0,16)	0,00 (0,16)	0,00 (0,16)	-0,02 (0,19)	0,28 (0,19)	0,37 (0,19)	0,0093	<sup>(2)</sup>
MTO-MAL	Linear	0,69 (0,13)	0,37 (0,14)	0,31 (0,14)	0,30 (0,14)							0,0133	0,3866
MAL-GAL	Quadrático	0,02 (0,21)	0,09 (0,10)	0,10 (0,10)	0,10 (0,10)	0,45 (0,11)	-0,08 (0,11)	-0,08 (0,11)	0,16 (0,13)	0,16 (0,13)	0,16 (0,13)	0,0569	<sup>(2)</sup>
SAC-LAC	Linear	15,90 (0,50)	0,34 (0,55)	2,86 (0,55)	2,35 (0,55)							0,0002	0,7765

<sup>(1)</sup> p 0,95; <sup>(2)</sup> Falta de Ajuste não calculada devido à ausência de erro no ponto central (ocorreu coeluição completa nos 3 experimentos). \* p 0,95, CIT: Citrimida; SOR: Ácido Sórbito, A: pH, B: SDS, C: SOR, RIB: Ribose, XIL: Xilose, FRU: Frutose, MAN: Manose, ARA: Arabinose, GLI: Glicose, GAL: Galactose, MAL: Maltose, MTO: Maltotriose, EPI: Epilactose, LTU: Lactulose, LAC: Lactose e SAC: Sacarose.

Cabe ressaltar que a separação dos CHOs presentes em matrizes de leite condensado, vinho, café, cereais e farelo de arroz foram atribuídos níveis das variáveis dentro da região experimental. Já para o método aplicado para a separação de CHOs em suco de frutas, cujos compostos de interesse apresentaram excelente separação em todos os ensaios realizados, foi permitido uma extrapolação dos níveis, na intenção de reduzir ainda mais o tempo de corrida. Tendo em vista que através desse modo de separação o aumento dos níveis das variáveis ocasionou o aumento do tempo de corrida e a redução do sinal analítico, em todas as condições de desejabilidade, foi atribuído o desejo de minimizar as concentrações das variáveis, desde que fossem obtidas resoluções maiores que 3.

O algoritmo previu condições experimentais que atenderam aos critérios de resolução estabelecidos para os seis métodos. Em alguns casos foi obtida mais de uma resposta. Nestas situações, optou-se por testar experimentalmente a condição que apresentava menor concentração das variáveis para obter o menor tempo de corrida possível. O emprego do método de otimização simultânea permitiu a obtenção de seis métodos diferentes, os quais, quando testados experimentalmente, resultaram na separação do conjunto de padrões de CHOs de cada amostra. Decodificando os valores previstos para as variáveis estudadas, as condições experimentais ótimas estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 3: Condições de deseabilidade, respostas previstas pelos modelos e respostas observadas experimentalmente para a mistura de padrões

Matriz	Variáveis e Resoluções	Critérios de Deseabilidade para as Variáveis e Resoluções			Condição Prevista (Codificada)	Resoluções Previstas	Resoluções Observadas
		Meta	Limite mínimo	Limite Máximo			
Cereais Matinais	pH	Minimizar	-1,68	1,68	1,59		
	SDS	Minimizar	-1,68	1,68	1,42		
	SOR	Minimizar	-1,68	1,68	1,44		
	SAC-LAC	Maximizar	2,00	30,00		23,90	22,43
	LAC-LTU	Maximizar	2,00	10,00		2,47	2,76
	LTU-EPI	Maximizar	2,00	10,00		2,49	1,66
	EPI-MTO	Maximizar	2,00	10,00		4,59	4,54
	MTO-MAL	Maximizar	2,00	10,00		2,15	2,16
	MAL-GAL	Maximizar	2,00	10,00		2,31	2,43
	GAL-GLI	Maximizar	2,00	10,00		4,04	4,84
GLI-FRU	Maximizar	2,00	10,00		9,35	9,25	
Café	pH	Minimizar	-1,68	1,68	-0,14		
	SDS	Minimizar	-1,68	1,68	1,46		
	SOR	Minimizar	-1,68	1,68	-0,74		
	GAL-GLI	Maximizar	2,00	10,00		2,24	3,94
	GLI-ARA	Maximizar	2,00	10,00		3,48	3,20
	ARA-MAN	Maximizar	2,00	10,00		2,04	3,74
	MAN-FRU	Maximizar	2,00	10,00		2,01	1,72
	FRU-XIL	Maximizar	2,00	10,00		2,77	2,51
	XIL-RIB	Maximizar	2,00	10,00		4,16	4,20
Leite Condensado	pH	Minimizar	-1,68	1,68	0,82		
	SDS	Minimizar	-1,68	1,68	1,48		
	SOR	Minimizar	-1,68	1,68	0,89		
	LAC-LTU	Maximizar	2,00	10,00		2,46	2,88
	LTU-EPI	Maximizar	2,00	10,00		2,07	2,19
	EPI-GAL	Maximizar	2,00	10,00		3,50	2,33
	GAL-GLI	Maximizar	2,00	10,00		3,74	3,92
Suco de Laranja	pH	Entre	-3,00	0,00	-1,97		
	SDS	Entre	-1,68	3,00	-1,68		
	SOR	Entre	-2,00	3,00	-2,00		
	SAC-GLI	Minimizar	3,00	42,2		13,07	22,42
	GLI-FRU	Minimizar	3,00	9,50		5,98	7,53
Farelo de Arroz	pH	Minimizar	-1,68	1,68	-0,10		
	SDS	Minimizar	-1,68	1,68	-0,60		
	SOR	Minimizar	-1,68	1,68	0,46		
	GLI-ARA	Maximizar	2,00	30,00		3,14	2,76
	ARA-FRU	Maximizar	2,00	10,00		2,51	3,66
	FRU-XIL	Maximizar	2,00	10,00		2,45	2,26
Vinho	pH	Minimizar	-1,68	1,68	0,02		
	SDS	Minimizar	-1,68	1,68	0,18		
	SOR	Minimizar	-1,68	1,68	-0,56		
	SAC-GAL	Maximizar	2,00	40,00		23,97	26,2
	GAL-GLI	Maximizar	2,00	10,00		2,00	3,54
	GLI-ARA	Maximizar	2,00	10,00		3,10	2,69
	ARA-FRU	Maximizar	2,00	10,00		4,44	4,98
	FRU-XIL	Maximizar	2,00	10,00		2,48	2,93
	XIL-RIB	Maximizar	2,00	10,00		3,80	4,90

Tabela 4: Condições analíticas dos seis métodos de separação estudados

Matriz	Condições analíticas					
	pH	SDS (mmol.L <sup>-1</sup> )	SOR (mmol.L <sup>-1</sup> )	Comprimento do capilar (cm) <sup>(1)</sup>	Voltagem (kV)	Injeção (pressão/tempo)
Café	12,59	70,35	11,35	60	20	50 mbar / 5 s
Cereais Matinais	12,76	69,50	22,20	80	20	50 mbar / 5 s + 50 mbar / 1s de NaCl <sup>(2)</sup>
Suco de Laranja	12,40	0,00	5,00	60	25	50 mbar / 5 s
Farelo de Arroz	12,59	24,00	17,30	60	25	50 mbar / 5 s
Leite Condensado	12,68	70,80	20,00	80	25	50 mbar / 5 s + 25 mbar / 1 s NaCl <sup>(2)</sup>
Vinho	12,60	41,50	12,20	80	20	50 mbar / 5 s

<sup>(1)</sup> Capilares de 50 µm de diâmetro com bulbo estendido. <sup>(2)</sup> Solução de NaCl de 1,0 mol.L<sup>-1</sup>.

Sistema de detecção por DAD em 350 nm (referência em 275 nm).

Foi possível observar que, na maioria dos casos, as condições foram bem distintas para os diferentes conjuntos de CHOs. Com exceção das composições dos eletrólitos dos métodos para leite condensado e cereais matinais, que foram semelhantes, apresentando apenas a diferença de pH. Essa diferença ocorreu porque no método para separação dos CHOs da amostra de leite, os pares

observados foram LAC-LTU, LTU-EPI, EPI-GAL E GAL-GLI onde foram utilizadas as condições que apresentaram a melhor resolução entre os mesmos.

Já no método para CHOs em cereais, além dos analitos estudados para leite, entre os picos EPI-GAL, eluem mais dois compostos, a MTO e MAL, que precisam ser separados para essa amostra. Dessa forma, os pares de compostos alvos de estudos aumentam para seis, tornando necessário separar: LAC-LTU, LTU-EPI, EPI-MTO, MTO-MAL, MAL-GAL E GAL-GLI. A condição em pH um pouco mais baixo que para o método para amostra de leite condensado, foi o único que permitiu a resolução adequada entre os seis pares de interesse. Pode-se observar que o par mais crítico foi MAL-GAL, que coeluiu em 14 dos 17 experimentos do planejamento fatorial e somente apresentou separação em poucos experimentos: no experimento com níveis -1,68, 0 e 0, onde a resolução foi na ordem 1,52; nos níveis +1,68, 0, 0 com resolução 1,45 e nos níveis +1, +1 e +1 onde a resolução foi 1,31, confirmando que a redução do pH é favorável para a separação desses compostos.

Quanto à possibilidade de separar os 13 compostos simultaneamente para a aplicação do método em matrizes desconhecidas, foi observado que, na região experimental estudada, os modelos não predisseram condições analíticas para tanto. Nesse sentido, os pares de picos que apresentaram maiores dificuldades de separação foram a LTU-EPI, MAL-GAL, ARA-MAN e MAN-FRU. Através das predições dos modelos matemáticos, quando foi possível a separação dos dois primeiros pares, os outros coeluíram completamente, sendo que o contrário

também foi observado. Foi realizado o estudo estatístico de desejabilidade permitindo a extrapolação das variáveis para níveis fora da região experimental. O algoritmo previu a separação dos 13 compostos se utilizadas as três variáveis em níveis próximos de +3,00. No entanto, em ensaios experimentais, o aumento simultâneo das três variáveis promoveu a redução do sinal analítico, o aumento da altura do sinal do ruído, o aumento do tempo de corrida, além da falta de reprodutibilidade dos tempos de migração e das áreas entre as corridas.

Foi possível verificar que o modo de separação investigado permitiu a separação dos conjuntos de carboidratos presentes em cada amostra, separando os CHOs críticos. O planejamento composto central e o método de otimização simultânea de Derringer e Suich permitiram obter boa resolução entre CHOs das matrizes, com a obtenção do máximo de informações a respeito do sistema em apenas 17 experimentos.

### **3.2 Aplicação em Amostras de Alimentos e Bebidas**

Os seis métodos otimizados para os padrões dos CHOs presentes nos alimentos foram aplicados em amostras reais, Figura 1. No entanto, alguns ajustes foram necessários no sentido de resolver problemas de efeitos das matrizes, além de reduzir o tempo de corrida.

Para o método aplicado em amostra de suco de laranja, foi possível obter boa separação na amostra, inclusive reduzindo o comprimento do capilar para 60 cm e utilizando voltagem de 25 kV. A análise foi executada em 6,5 min.

Quanto ao método aplicado na amostra de leite condensado foi observado que, mesmo no capilar de 80 cm, não foi obtida boa separação devido aos elevados níveis de lactose presente, onde o pico da lactose sobrepôs o da lactulose. O aumento do comprimento do capilar para 112 cm também não melhorou a separação. Nessa situação, os estudos foram conduzidos no sentido de reduzir a largura da banda do pico de lactose. Nas pesquisas realizadas por Li Hai-Ling, Xu Hui-Bi e Gao Zhong-Hong [40] foi adicionado NaCl à amostra como método para pré-concentração on-line, observando a redução do alargamento de banda causado pelo excesso de amostra injetada. Nesse estudo, optou-se por injetar a amostra e, em seguida, injetar uma solução de NaCl  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  com pressões de 25 e 50 mbar durante 1, 2, 3, 4 e 5 segundos. Para a amostra em estudo, a separação completa dos picos foi obtida injetando NaCl durante 1 segundo com pressão de 25 mbar. Esse procedimento simples, realizado através da programação do equipamento, mostrou que a adição de NaCl reduziu a largura dos picos de lactose e lactulose, possibilitando a separação em capilar de 80 cm em 13,5 min.

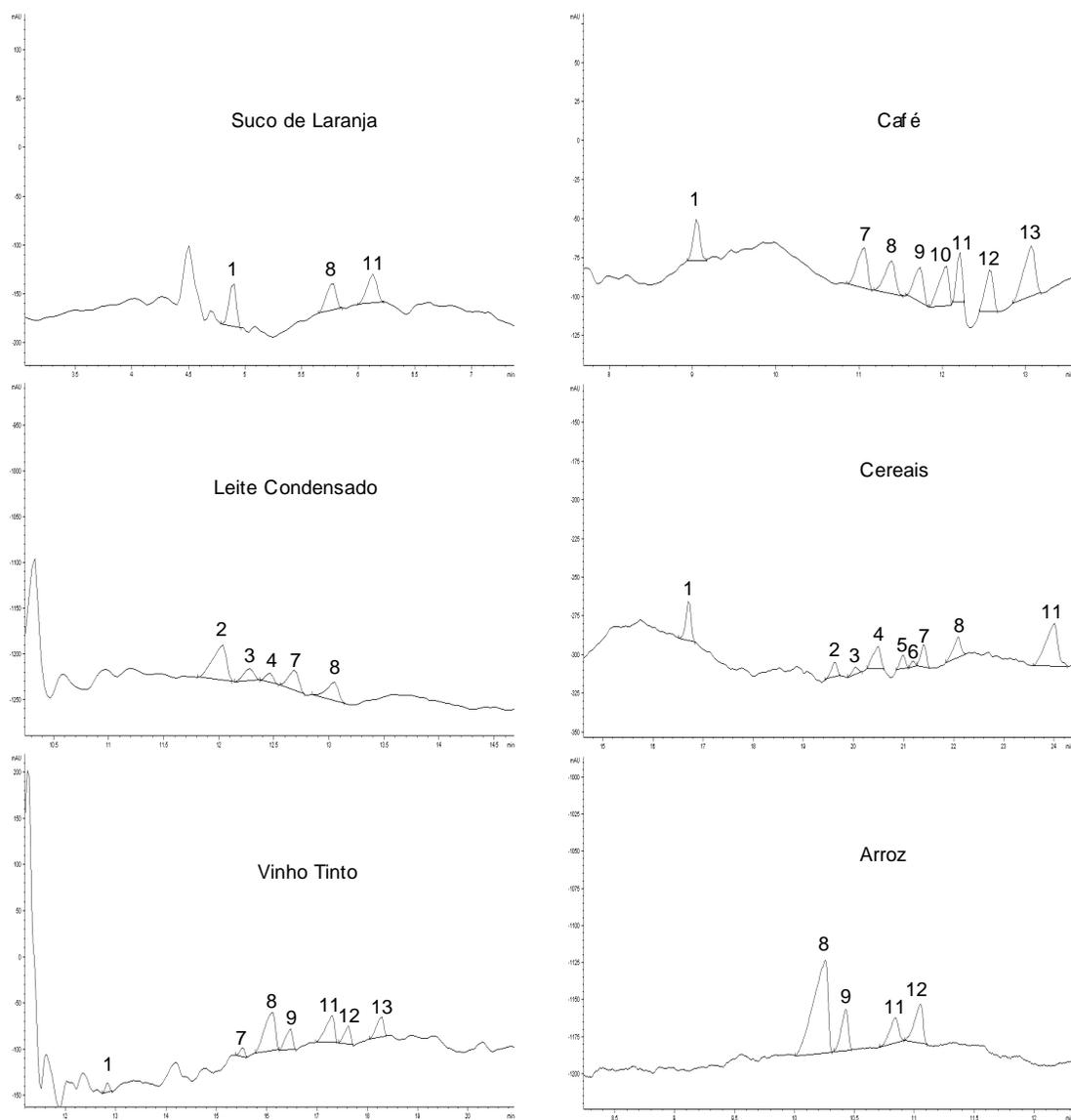


Figura 1: Eletroferogramas de Amostras. Identificação dos picos: 1 – sacarose, 2 – lactose, 3 – lactulose, 4 – epilactose, 5 – tesemaltotriose, 6 – maltose, 7 – galactose, 8 – glicose, 9 – arabinose, 10 – manose, 11 – frutose, 12 – xilose, 13 – ribose. Condições analíticas descritas na tabela 4.

O método desenvolvido para o conjunto de carboidratos presentes na amostra de cereais matinais, quando aplicado em amostra real, apresentou uma leve coeluição da maltose e galactose. Utilizando o mesmo princípio utilizado no método para leite condensado, foi obtida a separação dos picos através da injeção de NaCl em 50 mbar por 1s. O método apresentou tempo de corrida de 23 min.

No método para café torrado e moído, foi observado que a redução do capilar até 60 cm (com 20 kV) manteve uma separação adequada em amostra, com a redução do tempo de corrida para 14 min. No método para amostra de vinho tinto foi observada boa separação em capilar de 80 cm, em 19 minutos, não sendo possível a redução para 60 cm. Já no método para a amostra de farelo de arroz a redução do capilar até 60 cm manteve a separação dos picos da amostra, com voltagem de 20 kV, apresentando excelente separação em 11,5 min.

#### **4 CONCLUSÃO**

A técnica de MEKC com uso de surfactante aniônico, aliada a otimização multivariada do pH, concentração do eletrólito e do surfactante, e à função de desejabilidade de Derringer e Suich para otimizar várias respostas simultaneamente, foram utilizadas com eficiência para o desenvolvimento de seis métodos analíticos diferentes aplicados para a quantificação de CHOs em alimentos. Os métodos de otimização multivariados contribuíram para a obtenção do máximo de informações sobre as variáveis e permitiram realizar a predição matemática das resoluções entre os picos, utilizando somente 17 experimentos.

Os métodos foram aplicados para a separação de CHOs em leite condensado (lactose, lactulose, epilactose, galactose e glicose), farelo de arroz (glicose, arabinose, frutose e xilose), vinho tinto (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose), café torrado e moído (galactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose), suco de laranja (sacarose, glicose e frutose) e ainda cereais matinais (sacarose, lactose, lactulose, epilactose, maltotriose, maltose, galactose, glicose e frutose).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FARIAS, F. F; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, v.8, 2004.
- [2] FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition. USA: Ed. CRC Press., 2007.
- [3] BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. Introdução à química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1989.
- [4] VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche e productos lácteos: tecnologia, química y microbiología. Zaragoza: Acríbia, 1995.
- [5] CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I., LÓPEZ-SABATER, C. M. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance

liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1043, p 211-215, 2004.

[6] MESSIA, M.C.; CANDIGLUOTA, T.; MARCONI, E. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hidrolized milk. *Food Chemistry*, v. 104, p. 910-917, 2007.

[7] MONTILLA, A.; DEL CASTILLO, M.D.; SANZ, M.L.; OLANO, A. Egg shell as catalyst of lactose isomerisation to lactulose. *Food Chemistry*, v. 90, p 883-890, 2005.

[8] NOGUEIRA, T.; LAGO, C. L do. Detection of adulterations in processed coffee with cereal and coffe husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 32, p 3507-3511, 2009.

[9] MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 94-100, 2004.

[10] TRONCHONI, J., GAMERO, A.; LÓPEZ-ARROYO, F. N. ; BARRIO, E., QUEROL, A. Differences in the Glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 237-243, 2009.

[11] GARCIA-MARTÍN, N.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA-HERAS, M.; PÉREZ-MAGARINO, S. GONZÁLES-HUERTA, D. C.; Evaluation of several ultra- and manofiltration membranes for sugar control in winemaking. *Desalination*, v. 245, p. 554-558, 2009.

- [12] COLLINS, C. H. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 6ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- [13] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. *Journal of Chromatography A*, v. 1150, p. 312–319, 2007.
- [14] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, v. 681, p. 87-97, 1996.
- [15] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 716, p.231-240, 1995.
- [16] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 69, p 339-344, 2000.
- [17] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.
- [18] CHONGGONG, F.; LINAN, S.; YUZHI, F. Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 371, p. 81-87, 1998.

[19] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p. 56-64, 2003.

[20] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.

[21] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p 99-105, 2007.

[22] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 787, 1997. p 243-251.

[23] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p 586-594, 2007.

[24] SOGA, T.; IMAIZUMI, M. Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, aminoacids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis*, v. 22, p 3418–3425, 2001.

[25] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 261, p 73–78, 1998.

[26] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; HILDER, Emily F. MACKA, Miroslav; HADDAD, Paul R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v.27, p. 4039–4046, 2006.

[27] FRAZIER, R. A., AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. *Capillary electrophoresis for food analysis: Method development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000.

[28] BAO, Y.; NEWBURG, D. S.; ZHU, L. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human Milk by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 370, p 206–214, 2007.

[29] BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p 1439-1449, 2009.

[30] DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimizations of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12, 1980, pp.214-219. Citado por BRUNS, Roy. E; NETO, Benício de B.; SCARMINIO, Ieda S. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

[31] MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; TEIXEIRA-FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for

caffeine analysis in decaffeinated coffee. *Food Chemistry*, v. 120, p. 1155–1161, 2010.

[32] ORLANDINI, S.; GIANNINI, I.; PINZAUTI, S.; FURLANETTO, S. Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. *Talanta*, v. 74, p. 570-577, 2008.

[33] ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; ZIVANOVIC, L.; PROTIC, L. Application of multicriteria methodology in the development of improved RP-LC-DAD for determination of rizatriptan and its degradation products. *Chromatographia*, v. 68, p. 911-918, 2008.

[34] LOUKAS, Y.; SABBAH, S.; SCRIBA, G. Method development and validation for the chiral separation of peptides in the presence of cyclodextrins using capillary electrophoresis and experimental design. *Journal of Chromatography A*, v. 931, p. 141-152, 2001.

[35] LOMASNEY, A.; GUILLO, C.; SIDEBOTTOM, A.; ROPER, M. Optimization of capillary electrophoresis conditions for a glucagon competitive immunoassay using response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 394, p. 313-319, 2009.

[36] BOX, G.E.P.; HUNTER, J.S.; HUNTER, W.G. *Statistics for experimenters*. New York: Wiley, 2005.

[37] BRUNS, R.E., SCARMINIO, I.S., BARROS-NETO, B. *Statistical design – Chemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 2006.

[38] KLAMPFL, C.W., BUCHBERGER, W. Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis*, v. 22, p. 2737-2742, 2001.

[39] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 20, p. 493-511, 1997.

[40] LI, H. L.; XU, H. B.; GAO, Z. H. Determination of 3-Nitrotyrosine by Micellar Electrokinetic Chromatography with on-Column High-Salt Stacking. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 35, p. 1087-1091, 2007.



## **CAPÍTULO 5**

### **OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA DE TREZE CARBOIDRATOS POR MEKC COM TENSOATIVO ANIÔNICO**

**Adriana D. Meinhart, Cristiano A. Ballus, Roy E. Bruns, Helena T. Godoy**

**Departamento de Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

## OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA DE TREZE CARBOIDRATOS POR MEKC COM TENSOATIVO ANIÔNICO

Adriana D. Meinhart<sup>a</sup>, Cristiano A. Ballus<sup>a</sup>, Roy E. Bruns<sup>b</sup>, Helena T. Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil*

<sup>b</sup> *Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

### RESUMO

Os carboidratos são responsáveis por cerca de metade do aporte energético do ser humano e, no organismo, estão envolvidos nas mais variadas reações de metabolismo e síntese. Na indústria alimentícia, são responsáveis por diversos fenômenos que promovem efeitos químicos, físicos e sensoriais nos alimentos. São compostos de ações biológicas e tecnológicas distintas, mas de características físico-químicas semelhantes e, por isso, de difícil separação. Diversos métodos já foram desenvolvidos para a análise desses compostos. No entanto, dentre a literatura pesquisada, poucos estudos investigaram a possibilidade de separação simultânea dos 13 carboidratos geralmente encontrados em alimentos: glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose,

lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. Além disso, a otimização de metodologias geralmente foi realizada de forma univariada. Nesse estudo, foram utilizadas técnicas estatísticas multivariadas para a otimização do pH, da concentração do eletrólito e do tensoativo na separação dos carboidratos utilizando cromatografia eletrocinética micelar com uso de tensoativo aniônico. Utilizando um planejamento composto central aliado ao tratamento dos dados através da função de Derringer e Suich, foi possível realizar a avaliação simultânea de 23 respostas e prever as condições analíticas para a separação dos 13 compostos. As respostas previstas através das funções matemáticas também foram confirmadas experimentalmente. Esse estudo demonstrou que a cromatografia eletrocinética micelar, com uso de tensoativo aniônico, foi eficaz para a separação simultânea dos 13 carboidratos mais comuns em alimentos, tornando-se uma boa alternativa para a análise de matrizes onde a separação de todos estes compostos é de fundamental importância.

## **ABSTRACT**

Carbohydrates are responsible for about half of the human being energetic requirements and, in the organism, they are involved in a large variety of metabolic and synthetic reactions. In the food industry, they are related to several phenomena that promote chemical, physical and sensorial effects in foods. They are compounds with different biological and technological actions, however, with similar physico-chemical characteristics and, because of this, they are hard to

separate. There are several methods developed for the analysis these compounds. Nevertheless, in the research literature, there are few studies investigating the simultaneous separation of the 13 carbohydrates commonly found in foods: glucose, fructose, sucrose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, mannose, maltose, xylose, ribose and maltotriose. Moreover, the optimization strategy generally were univariate. In this study, multivariate statistical techniques were employed to optimize pH and surfactant and electrolyte concentrations in carbohydrate separation using micellar electrokinetic chromatography with an anionic surfactant. The use of a central composite design and Derringer and Suich's desirability function enabled the simultaneous evaluation of 23 responses and the predicted analytical conditions for the separation of 13 compounds. The responses predicted by mathematical functions were confirmed experimentally. This study showed that micellar electrokinetic chromatography, with an anionic surfactant, was effective for the simultaneous separation of 13 carbohydrates commonly found in foods, what makes it a good option for the analysis of complex matrices where the overall separation of these compounds is very important.

## 1. INTRODUÇÃO

A glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose são os carboidratos (CHOs) mais comuns em alimentos como frutas, verduras, leite, cereais e seus derivados. A composição de CHOs nos alimentos tem sido observada com maior

freqüência entre os consumidores devido ao aumento da obesidade, diagnosticada em 40% da população brasileira adulta em 2004; do diabetes, em 7,6% da população urbana; e do aumento dos casos de intolerância à lactose, sacarose e sacarose-isomaltose em crianças e adultos [1-3]. Do ponto de vista industrial, a composição dos CHOs é importante pois contribuem decisivamente para a obtenção das características do produto final, tais como a cor, o aroma e a textura dos alimentos. Também estão relacionados com o controle de qualidade pois interferem na conservação dos produtos (como geléias, frutas cristalizadas, sucos concentrados, vinhos, doces e outros). Em alimentos fermentados, são imprescindíveis para que ocorram as reações necessárias para a obtenção do produto final.

Os CHOs podem ser definidos como poli-hidroxiáldeídos, poli-hidroxicetonas, poli-hidroxiálcoois, poli-hidroxiácidos e seus derivados simples, e polímeros desses compostos unidos por ligações hemiacetálicas [4]. São compostos neutros ou ligeiramente ácidos. Possuem massas moleculares e características estruturais muito semelhantes e não absorvem a radiação na região do UV [5-7]. Essas propriedades dificultam a separação e detecção dos CHOs.

A eletroforese capilar (EC) vem sendo muito utilizada para análise de CHOs e a principal razão é que a separação dos analitos é baseada na migração diferenciada dos compostos iônicos quando estes estão dissolvidos ou suspensos em um eletrólito, sob a ação de um campo elétrico; e, embora os CHOs sejam

considerados neutros, em pH acima de 11,5 existem na forma aniônica [7]. O capilar de sílica fundida suporta o uso de eletrólitos com valores de pH extremos, facilitando a utilização da propriedade de ionização para obter uma melhor separação dos CHOs em estudo. Além disso, a técnica proporciona separações de alta eficiência (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), boa resolução e seletividade. As análises são econômicas, rápidas, requerem baixo consumo de reagentes e geram baixos volumes de resíduos. Além disso, na maioria dos casos, os resíduos são sais simples e podem ser descartados sem tratamento [5,8-12].

Dentre os modos de separação já estudados para EC em análise de CHOs, destacam-se a eletroforese capilar de zona e a cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), com uso de surfactante catiônico ou aniônico [5,10,13-23]. Em MEKC são utilizados agentes tensoativos, que em geral contém um grupo polar e/ou iônico como *cabeça* ligado a uma *cauda* apolar, por exemplo, uma cadeia alifática constituindo um monômero. Em condições apropriadas, os monômeros podem se agregar formando entidades como vesículas e micelas. Solutos polares podem se associar à superfície da micela, através de interações do tipo dipolo-dipolo ou íon-dipolo com os grupos polares (ou iônicos) da *cabeça* do tensoativo. Fortes interações coulômbicas (atrativas e repulsivas) podem resultar quando o soluto apresenta carga [12].

A MEKC com surfactante aniônico é um modo de separação empregado em diversas análises em alimentos. É baseado na partição diferenciada dos analitos entre duas fases, a fase micelar e o eletrólito de corrida [24]. Ainda

existem poucos estudos sobre a separação de CHOs utilizando esse modo de separação, mas Bao, Newburg e Zhu [23] observaram bons resultados na separação para oligossacarídeos em leite humano utilizando MEKC com o uso de surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS). Meinhart *et al.* [25] verificaram boa interação do SDS na separação do mesmo conjunto de compostos aqui estudados. Os autores concluíram que os fatores pH, SDS e ácido sórbico (SOR) foram significativos para a separação. No entanto, o uso das três variáveis em altas concentrações melhorou a resolução mas reduziu o sinal analítico. Nos níveis em que os autores estudaram as variáveis, não foi possível obter a separação dos 13 carboidratos, no entanto, os modelos matemáticos indicaram que o deslocamento das variáveis para níveis maiores poderia resultar em efeitos que permitam a separação simultânea dos compostos.

Por isso, nesse trabalho, foi realizado um estudo do efeito da concentração de NaOH, SDS e SOR em níveis mais elevados, a fim de verificar a possibilidade da separação simultânea dos 13 CHOs mais encontrados em alimentos. Tendo em vista que em EC, condições muito drásticas de eletrólito podem ocasionar instabilidades químicas do sistema, foram incluídas outras respostas, além das resoluções dos compostos, como a variação dos tempos de migração, variação da linha de base, altura do sinal analítico em relação ao ruído e o tempo de corrida.

A otimização da separação simultânea dos 13 CHOs foi realizada de forma multivariada utilizando um planejamento composto central de três variáveis. Foram otimizadas 23 respostas simultaneamente, envolvendo as resoluções dos

compostos adjacentes e que coeluíram (19), a variação do tempo de migração, a variação da linha de base, da relação entre altura do sinal analítico/sinal do ruído e o tempo de corrida através do método de Derringer e Suich.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes e soluções

Os padrões de sacarose (SAC), D-lactose (LAC), lactulose (LTU), epilactose (EPI), maltotriose (MTO), D-(+)-maltose (MAL), D-(+)-glicose (GLI), D-(-)-arabinose (ARA), D-(+)-manose (MAN), D-(-)-frutose (FRU) e D-(-)-ribose (RIB) foram obtidos da Sigma Chemical - EUA. D-(+)-galactose (GAL) e D-xilose (XIL) foram obtidos da Chem Service - EUA. Hidróxido de sódio foi obtido da Nuclear, ácido sórbico (SOR) da Sigma – EUA e dodecilsulfato de sódio (SDS) da Riedel-de-Haën (Alemanha). Todos os reagentes utilizados possuem elevada pureza analítica. A água ultrapura foi obtida do sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, France). Todas as soluções foram degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) antes da injeção. As soluções estoque de padrões de CHOs ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram mantidas sob congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o preparo das soluções de trabalho.

## 2.2 Instrumentação

Os experimentos foram executados usando um equipamento de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technology, Alemanha) com um detector de arranjo de diodos. A separação foi otimizada em capilar de sílica fundida, de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro com bulbo estendido por 80 cm de comprimento total (72 cm de comprimento efetivo), adquirido da Agilent (Alemanha). As condições de temperatura, voltagem e injeção foram mantidas fixas em 25°C, 20 kV e injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 5 s. A detecção foi indireta em 350 (10) nm com referência em 275 (10) nm.

## 2.3 Otimização Multivariada

A separação simultânea dos 13 CHOs foi otimizada utilizando um planejamento composto central, com pontos central e axiais. As variáveis e níveis foram estipulados com base nos resultados obtidos por Meinhart *et al.* [25]. Foram investigados os efeitos da concentração de hidróxido de sódio na faixa de 98,2 a 131,8  $\text{mmol.L}^{-1}$  (níveis -1,68 a +1,68), da concentração do tensoativo SDS entre 0 e 50,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  e da concentração do eletrólito ácido sórbico entre 11,2 e 30,0  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Não foram utilizados níveis mais elevados de SDS e SOR porque em testes preliminares foi observado que elevadas variações da linha de base e baixa relação entre altura do sinal analítico e do ruído inviabilizaram a identificação dos compostos.

Os experimentos foram realizados através da injeção de uma solução padrão contendo uma mistura dos 13 CHOs, na concentração de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>. A identificação dos compostos foi realizada através da fortificação da mistura de padrões com cada um dos compostos individualmente. Para a medida do erro experimental, o ponto central foi realizado em triplicata. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

As respostas estudadas foram baseadas nas resoluções dos compostos e em medidas de estabilidade do sistema, detectabilidade e tempo de corrida. As resoluções foram calculadas entre os compostos que coeluíram ou estiveram adjacentes em um ou mais dos experimentos. Tendo em vista que o uso dos níveis mais elevados de pH, SOR e SDS podem gerar instabilidade química do sistema, mais quatro respostas foram estudadas: a razão entre a altura do sinal analítico/altura do sinal do ruído (ALT S/R); o coeficiente de variação dos tempos de migração entre replicatas de injeção, n=5 (CV TM), a variação da linha de base entre o primeiro e último pico (VLB) e, por último, o tempo de corrida (TEMPO). Ao total, foram estudados 19 respostas de resoluções, calculadas conforme a equação abaixo, e mais 4 dos demais parâmetros.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

onde Rs = resolução, t = tempo de migração e W = largura do pico.

Para a otimização simultânea das respostas, foi utilizada a ferramenta de Derringer e Suich, com o objetivo de maximizar ou minimizar as respostas de forma simultânea. A condição otimizada de separação prevista pelos modelos foi confirmada experimentalmente no conjunto de padrões analíticos. O tratamento dos dados foi feito através do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA, 95% de confiança).

#### **2.4 Procedimentos de Análise**

Antes do estudo analítico de cada condição do planejamento fatorial, o capilar foi condicionado por lavagem sob pressão de 1000 mbar com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de 5 minutos de lavagem com água purificada e de 10 minutos com o eletrólito de corrida. Para evitar adsorção de solutos no capilar, entre as replicatas de injeção de condição idêntica, o capilar foi lavado com eletrólito de corrida durante 2 minutos. Todos os eletrólitos foram filtrados em membrana celulósica de 0,45 µm de porosidade e centrifugados por 10 minutos a 5000 RPM (Excelsa II, mod. 206 BL, Fanem, Brasil) para remoção de ar dissolvido.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Otimização das Metodologias Analíticas

Na tabela 1 estão apresentados os níveis estudados e os resultados de resolução obtidos para cada par de compostos que coeluíram ou estiveram adjacentes nos experimentos, além do coeficiente de variação dos tempos de migração (CV TM), variação da linha de base medida entre o primeiro e o último composto eluído (VLB), relação entre a altura do sinal analítico/altura do sinal do ruído (ALT S/R) e tempo de análise (TEMPO). Os analitos apresentaram a seguinte ordem de eluição: SAC, LAC, LTU, EPI, MTO, MAL, GAL, GLI, MAN, ARA, FRU, XIL, XIL, RIB, exceto a MAN e ARA que eluíram na ordem inversa em um experimento.

A partir da tabela de respostas foi possível observar que ocorreram 23 coeluições entre diferentes compostos durante os experimentos, indicando a dificuldade de separação desses CHOs. O elevado número de coeluições gerou o aumento da quantidade de respostas a serem otimizadas simultaneamente.

Através da observação dos dados experimentais, pode-se verificar que as três variáveis estudadas apresentaram efeitos importantes sobre as respostas. O efeito do pH foi positivo para o aumento de todas as respostas, salvo para a resolução entre LAC-LTU, GLI-MAN e ALT S/R, CV TM, VLB e TEMPO.

Tabela 1: Níveis das variáveis estudadas e respostas experimentais observadas

Variáveis Decodificadas <sup>(1)</sup>			Respostas experimentais avaliadas na otimização <sup>(2)</sup>											
pH	SOR	SDS	LAC-LTU	LTU-EPI	LTU-MTO	LTU-MAL	LTU-GAL	EPI-MTO	EPI-MAL	EPI-GAL	MTO-MAL	MTO-GAL	MAL-GAL	MAN-ARA
105	15	10	1,7	1,5	5,7	6,4	7,7	4,3	5,0	6,4	0,7	2,2	1,6	0,6
105	15	40	1,5	2,1	5,8	6,9	10,3	4,5	5,8	9,4	1,1	2,9	1,6	0,8
105	26,2	10	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,8
105	26,2	40	2,4	2,5	5,2	6,2	8,3	3,7	5,0	7,3	1,3	2,8	1,3	0,0
125	15	10	1,5	1,3	5,1	7,4	9,8	4,5	6,9	9,6	1,3	3,2	2,2	2,2
125	15	40	1,5	2,0	7,3	8,9	10,9	6,9	8,9	11,5	1,3	3,4	2,2	3,4
125	26,2	10	2,7	2,6	7,3	9,3	12,3	5,3	7,3	10,2	1,5	3,6	2,2	1,3
125	26,2	40	2,2	2,8	6,3	8,7	9,6	4,6	6,9	8,0	1,1	2,4	1,5	2,1
115	20,6	25	1,9	2,0	4,8	7,6	8,7	3,7	6,6	8,0	0,9	2,2	1,9	1,0
115	20,6	25	2,7	2,5	6,4	8,8	11,7	4,4	6,5	9,2	1,4	3,3	2,1	1,3
115	20,6	25	2,2	2,2	5,7	7,4	9,9	4,0	5,8	8,4	1,5	3,5	1,9	0,9
98,2	20,6	25	1,7	1,3	3,0	4,2	5,3	1,8	3,0	4,2	1,0	2,2	1,3	0,0
131,8	20,6	25	1,0	1,4	4,8	9,1	11,5	3,5	6,7	9,0	0,9	2,5	2,9	2,6
115	11,2	25	1,6	1,6	6,1	7,8	9,2	5,5	7,5	9,2	1,2	3,2	2,2	2,5
115	30,0	25	2,9	2,3	5,0	6,9	9,3	3,2	4,8	7,0	1,1	2,6	1,5	0,0
115	20,6	0,0	1,4	1,2	3,8	4,9	6,2	3,0	4,1	5,7	1,2	2,7	1,5	0,0
115	20,6	50,2	1,7	1,5	5,0	7,0	8,2	4,7	7,3	8,9	1,2	2,8	2,0	1,9

Variáveis Decodificadas <sup>(1)</sup>			Respostas experimentais avaliadas na otimização <sup>(2)</sup>										
pH	SOR	SDS	MAN-FRU	ARA-FRU	SAC-LAC	GAL-GLI	GLI-MAN	FRU-XIL	XIL-RIB	VLB	CV TM	ALT S/R	TEMPO
105	15	10	1,9	1,7	15,4	3,1	4,8	4,5	4,4	68,0	8,4	6,5	30,1
105	15	40	3,0	2,5	14,1	3,1	4,7	7,3	3,8	113,0	1,7	2,0	25,6
105	26,2	10	1,2	4,7	13,4	2,1	5,4	2,4	3,7	19,2	4,2	6,1	19,5
105	26,2	40	2,4	2,4	23,5	3,9	6,2	5,6	4,6	35,0	3,4	2,0	26,1
125	15	10	4,5	1,6	15,1	3,7	4,5	6,7	4,3	50,0	1,7	1,7	26,7
125	15	40	4,2	1,0	19,0	3,5	4,1	7,2	6,6	108,0	3,1	0,6	32,0
125	26,2	10	2,8	1,6	20,7	3,6	4,0	5,3	5,4	36,0	2,3	2,5	28,3
125	26,2	40	4,2	2,3	23,5	3,0	4,7	6,8	4,7	51,0	7,7	1,6	34,7
115	20,6	25	2,5	2,0	18,3	3,1	4,4	5,5	3,9	35,0	1,5	2,7	26,4
115	20,6	25	3,2	2,2	19,3	3,4	5,1	5,2	4,4	41,8	2,2	2,0	30,3
115	20,6	25	2,5	1,7	19,6	3,5	4,3	5,7	4,7	45,3	0,6	2,3	26,7
98,2	20,6	25	1,5	1,5	15,9	3,5	4,5	3,8	3,9	39,0	2,2	2,5	23,9
131,8	20,6	25	3,6	0,7	17,0	4,7	3,7	8,1	4,6	100,0	6,4	0,4	35,0
115	11,2	25	4,2	1,8	16,4	3,6	5,3	7,3	5,1	62,0	4,2	1,1	31,0
115	30,0	25	1,8	1,8	23,7	3,6	5,0	5,3	5,3	48,0	3,4	1,3	26,7
115	20,6	0,0	1,7	1,7	13,5	3,4	4,8	5,0	4,3	58,0	7,1	1,4	26,8
115	20,6	50,2	3,2	1,7	18,4	4,0	4,7	6,2	4,7	85,0	0,6	1,1	28,0

<sup>(1)</sup> Concentrações em mmol.L<sup>-1</sup>; <sup>(2)</sup> Respostas e unidades: Resoluções: LAC-LTU, LTU-EPI, LTU-MTO, LTU-MAL, LTU-GAL, EPI-MTO, EPI-MAL, EPI-GAL, MTO-MAL, MTO-GAL, MAL-GAL, MAN-ARA, MAN-FRU, ARA-FRU, SAC-LAC, GAL-GLI, GLI-MAN, FRU-XIL, XIL-RIB; Variação da linha de base entre o primeiro e último pico, em mAU: VLB (n=5); Coeficiente de variação do tempo de migração (n=5): CV TM; Razão entre Altura do Sinal analítico e do ruído: ALT S/R; Tempo de corrida (min): TEMPO.

Já o aumento da concentração de ácido sórbico foi positivo para a separação do par LAC-LTU, contribuiu para a redução do tempo de corrida e estabilização da linha de base (até níveis intermediários), por outro lado, mostrou efeito negativo para a resolução de LTU-MAL, LTU-GAL, EPI-MTO, EPI-MAL, EPI-GAL, MAN-ARA, MAN-FRU e FRU-XIL.

Os efeitos do SDS foram positivos para melhorar a resolução de LTU-EPI, LTU-MAL, LTU-GAL, EPI-MTO, EPI-MAL, EPI-GAL, MAN-ARA, MAN-FRU, SLC-LAC e FRU-XIL. Outro efeito importante foi que o aumento do SDS apresentou a redução do CV TM. No entanto, reduziu a ALT S/R, aumentou a VLB e o tempo de corrida.

Seria inviável, do ponto de vista prático, fazer a previsão individual de cada uma das 23 respostas para obter uma única condição experimental que atendesse aos requisitos desejados. Por isso, foram plotados os modelos matemáticos a fim de utilizar ferramentas de otimização simultânea de respostas para prever a condição ótima.

A tabela 2 sumariza os modelos matemáticos obtidos para o conjunto de dados experimentais, bem como apresenta a verificação para a falta de ajuste e a significância das regressões.

Tabela 2: Validação dos Modelos Matemáticos

Respostas Estudadas	Modelo Indicado	Coeficientes (erro)										Significância Regressão <sup>(1)</sup> (Valor F)	Ajuste Modelo <sup>(2)</sup> (Valor F)
		Inter-cepto	A-pH	B-SOR	C-SDS	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	AB	AC	BC		
Res. <sup>(3)</sup> LAC-LTU	Linear	2,02 (0,12)	-0,19 (0,13)	0,51 (0,13)	-0,11 (0,13)							5,86	1,77
Res.LTU-EPI	Modificado <sup>(9)</sup>	1,80 (0,14)	0,21 (0,15)	0,15 (0,15)	0,33 (0,15)			0,40 (0,20)	-0,26 (0,20)	0,18 (0,20)		2,33 <sup>(8)</sup>	7,15
Res.LTU-MTO	Média <sup>(10)</sup>	5,14 (0,42)										-	4,83
Res.LTU-MAL	Linear	6,91 (0,38)	1,69 (0,43)	-0,50 (0,43)	0,81 (0,43)							6,91	4,86
Res.LTU-GAL	Modificado	8,76 (0,43)	1,97 (0,48)	-0,60 (0,48)	0,93 (0,48)			1,36 (0,63)	-1,56 (0,63)	0,24 (0,63)		5,43	1,58
Res.EPI-MTO	Linear	3,98 (0,25)	0,85 (0,28)	-0,77 (0,28)	0,63 (0,28)							7,39	11,56
Res. EPI-MAL	Linear	5,78 (0,26)	1,50 (0,29)	-0,88 (0,29)	0,93 (0,29)							15,05	6,35
Res. EPI-GAL	Linear	7,75 (0,41)	1,78 (0,45)	-1,09 (0,45)	1,13 (0,45)							9,19	8,24
Res. MTO-MAL	Modificado	1,09 (0,077)	0,14 (0,086)	-0,053 (0,086)	0,10 (0,086)			0,069 (0,11)	-0,25 (0,11)	0,068 (0,11)		1,68 <sup>(8)</sup>	0,77
Res. MTO-GAL	Modificado	2,67 (0,16)	0,37 (0,18)	-0,28 (0,18)	0,19 (0,18)			0,23 (0,24)	-0,55 (0,24)	0,10 (0,24)		2,38 <sup>(8)</sup>	0,82
Res. MAL-GAL	Linear	1,77 (0,095)	0,46 (0,11)	-0,27 (0,11)	0,11 (0,11)							8,87	14,63
Res. MAN-ARA	Linear	1,05 (0,13)	1,08 (0,14)	-0,77 (0,14)	0,60 (0,14)							34,68	7,71
Res. MAN-FRU	Linear	2,85 (0,11)	0,77 (0,12)	-0,52 (0,12)	0,45 (0,12)							23,02	1,28
Res. ARA-FRU	Média	1,95 (0,20)										-	14,61

Continuação da tabela 2.

Respostas Estudadas	Modelo Indicado	Coeficientes (erro)										Significância Regressão <sup>(1)</sup> (Valor F)	Ajuste Modelo <sup>(2)</sup> (Valor F)
		Inter-cepto	A-pH	B-SOR	C-SDS	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	AB	AC	BC		
Res. SAC-LAC	Linear	18,06 (0,55)	1,00 (0,61)	2,19 (0,61)	1,75 (0,61)							7,87	13,05
Res. GAL-GLI	Modificado	3,46 (0,11)	0,27 (0,12)	-0,062 (0,12)	0,14 (0,12)				-0,04 (0,16)	-0,34 (0,16)	0,18 (0,16)	2,01 <sup>(8)</sup>	6,07
Res. GLI-MAN	Quadrático	4,59 (0,24)	-0,37 (0,11)	0,12 (0,11)	0,06 (0,11)	-0,15 (0,12)	0,23 (0,12)	0,07 (0,12)	-0,25 (0,15)	-0,03 (0,15)	0,27 (0,15)	2,86 <sup>(8)</sup>	0,96
Res. FRU-XIL	Linear	5,76 (0,17)	0,99 (0,19)	-0,65 (0,19)	0,73 (0,19)							17,73	9,28
Res. XIL-RIB	Média	4,62 (0,17)										-	2,98
CV TM <sup>(4)</sup>	Modificado	3,58 (0,49)	0,30 (0,54)	0,10 (0,54)	-0,85 (0,54)				0,96 (0,71)	1,78 (0,71)	1,24 (0,71)	2,34 <sup>(8)</sup>	6,67
ALT S/R <sup>(5)</sup>	Linear	2,21 (0,31)	-1,01 (0,34)	0,14 (0,34)	-0,83 (0,34)							4,81	16,13
VLB <sup>(6)</sup>	Linear	58,49 (4,90)	8,23 (5,47)	-16,22 (5,47)	13,13 (5,47)							5,60	17,57
TEMPO <sup>(7)</sup>	Modificado	28,10 (0,47)	2,86 (0,53)	-0,96 (0,53)	1,17 (0,53)				1,81 (0,69)	1,20 (0,69)	1,53 (0,69)	8,85	0,75

<sup>(1)</sup>  $F_{9,7}$  95% = 3,68; <sup>(2)</sup>  $F_{5,2}$  95% = 19,30; <sup>(3)</sup> Res. = Resolução; <sup>(4)</sup> Coeficiente de Variação (n=5) ; <sup>(5)</sup> Altura do sinal analítico / Altura do Sinal Ruído; <sup>(6)</sup> Variação da linha de base entre o primeiro e o último pico (mUA); <sup>(7)</sup> Tempo de corrida (min): tempo do último pico acrescido de um minuto; <sup>(8)</sup> Modelos com regressões não significativas; <sup>(9)</sup> Modelo onde a menor falta de ajuste e a melhor significância da regressão ocorreu quando foram considerados somente o modelo linear e as interações entre dois fatores; <sup>(10)</sup> Modelo onde as respostas não apresentaram efeitos significativos pelas variações das variáveis estudadas.

A escolha do modelo mais indicado foi baseada na análise de variância (95%) onde foram selecionados os modelos que não apresentaram falta de ajuste e que mostraram melhor significância da regressão. Todos os modelos utilizados apresentaram ajuste adequado já que os valores de F foram menores que o F crítico ( $F_{5,2} 95\% = 19,30$ ). Quanto às regressões, dentre as 23 respostas, 6 apresentaram que a regressão não foi significativa, sendo que os valores de F foram menores que o F crítico ( $F_{9,7} 95\% = 3,68$ ), permanecendo entre 1,68 e 2,86. Isso indica que esses modelos não foram afetados pelas variáveis estudadas.

Para a otimização simultânea das respostas, foi utilizada a ferramenta de Derringer e Suich com o objetivo foi maximizar as resoluções e a ATL S/R e minimizar o CV TM, a VLB e o TEMPO. Assim, foram construídas funções de desejabilidade lineares unilaterais para maximização e minimização. Para maximização das resoluções, por exemplo, as equações foram:

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad R_{Si} < R_{Si}^{min} \quad (1)$$

$$d_i = \left( \frac{R_{Si} - R_{Si}^{min}}{R_{S\ alvo} - R_{Si}^{min}} \right) \quad \text{se} \quad R_{Si}^{min} \leq R_{Si} \leq R_{S\ alvo} \quad (2)$$

$$d_i = 1 \quad \text{se} \quad R_{Si} > R_{S\ alvo} \quad (3)$$

Para minimização, como o tempo de corrida, as equações resultaram em:

$$d_i = 1 \quad \text{se} \quad t_i < t_{alvo} \quad (4)$$

$$d_i = \left( \frac{t_i - t_i^{max}}{t_{alvo} - t_i^{max}} \right) \quad \text{se} \quad t_i^{max} \leq t_i \leq t_{alvo} \quad (5)$$

$$d_i = 0 \quad \text{se} \quad t_i > t_i^{max} \quad (6)$$

onde  $d_i$  corresponde à desejabilidade (ente 0 e 1),  $R_{Si}$  e  $t_i$  são os valores preditos pelo modelo,  $R_{S\ alvo}$  e  $t_{alvo}$  são os valores alvo das respostas,  $R_{Si}^{min}$  é o valor mínimo da resposta e  $t_i^{max}$  corresponde ao valor máximo da resposta.

Na tabela 3 estão apresentados os critérios estabelecidos para a obtenção das condições otimizadas, a condição ótima prevista pelos modelos, bem como as respostas previstas. A condição ótima foi avaliada experimentalmente e as respostas observadas também estão apresentadas na tabela.

Tabela 3: Condições de desejabilidade, respostas previstas pelos modelos e respostas observadas experimentalmente

Variáveis e Respostas	Critérios de Desejabilidade para as Variáveis e Respostas				Condição Prevista (Codificada)	Respostas Previstas	Respostas Observadas
	Meta	Limite Mínimo	Limite Máximo	Importância			
pH	Minimizar	-1,68	1,68	3	1,66		
SOR	Minimizar	-1,68	1,68	3	0,43		
SDS	Minimizar	-1,68	1,68	3	-0,82		
LAC-LTU	Maximizar	2	30	3		2,0	2,6
LTU-EPI	Maximizar	2	30	3		2,5	1,5
LTU-MTO	Maximizar	2	30	3		5,1	8,3
LTU-MAL	Maximizar	2	30	3		8,8	9,3
LTU-GAL	Maximizar	2	30	3		14,0	9,1
EPI-MTO	Maximizar	2	30	3		4,5	6,1
EPI-MAL	Maximizar	2	30	3		7,1	7,3
EPI-GAL	Maximizar	2	30	3		9,3	7,5
MTO-MAL	Maximizar	1,5	30	3		1,6	1,3
MTO-GAL	Maximizar	2	30	3		3,9	2,7
MAL-GAL	Maximizar	2	30	3		2,3	1,6
MAN-ARA	Maximizar	2	30	3		2,0	2,3
MAN-FRU	Maximizar	2	30	3		3,5	4,0
ARA-FRU	Maximizar	1,5	30	3		1,9	1,5
SAC-LAC	Entre	2	30	3		19,2	20,9
GAL-GLI	Entre	2	30	3		4,1	3,3
GLI-MAN	Entre	2	30	3		3,4	4,6
FRU-XIL	Entre	2	30	3		6,5	7,7
XIL-RIB	Entre	2	30	3		4,6	5,2
CV TM	Minimizar	0	3	3		2,6	3,1
VLB	Minimizar	0	150	5		54,4	45,0
S/R	Maximizar	0	50	5		1,3	3,1
TEMPO	Minimizar	0	35	5		30,6	31,7

Comparando os valores previstos com os valores observados experimentalmente pode-se observar uma boa correlação. Os pares de resolução que envolveram a LTU foram os que apresentaram maiores variações. Essas, podem ser decorrentes de pequenas variações experimentais já que o pico da lactulose foi um dos mais afetados pelas variáveis e níveis estudados. Na Figura 1 está apresentado o eletroferograma obtido experimentalmente com a separação dos 13 CHOs. As ferramentas multivariadas se mostraram eficientes já que são compostos muito semelhantes e de difícil separação, sobre os quais não foram encontrados trabalhos na literatura relatando a separação simultânea.

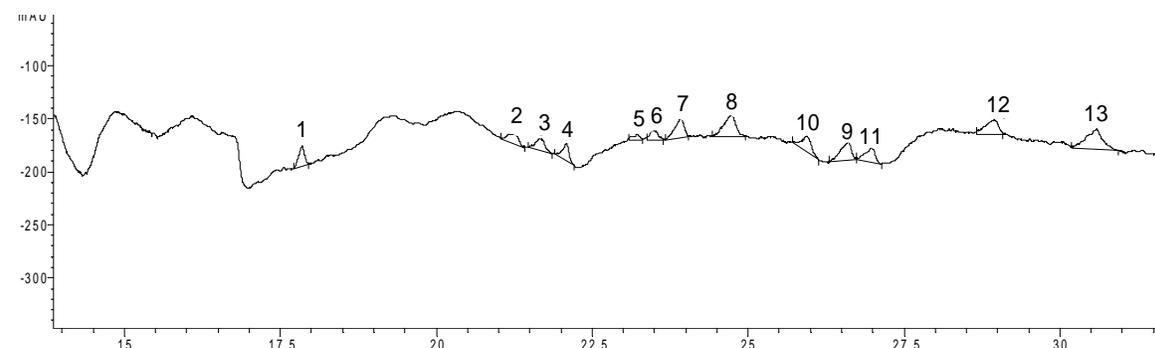


Figura 1: Eletroferograma da condição prevista pelos modelos. Identificação dos picos: 1 – sacarose, 2 – lactose, 3 – lactulose, 4 – epilactose, 5 – maltotriose, 6 – maltose, 7 – galactose, 8 – glicose, 9 – arabinose, 10 – manose, 11 – frutose, 12 – xilose, 13 – ribose. Mistura de padrões contendo  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Condições analíticas: Eletrólito:  $132 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaOH (pH 12,8),  $23,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SOR e  $13,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SDS, capilar de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  por  $80 \text{ cm}$  (comp. Total),  $20 \text{ kV}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , injeção de  $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ , detecção em  $350 \text{ nm}$  (referência  $275 \text{ nm}$ ).

A partir da Figura 1, pode ser observado que a condição ótima de separação para os 13 carboidratos em estudo apresentou baixa relação sinal/ruído, indicando que há necessidade de mais estudos para melhorar a detectabilidade do método. Esse método, se utilizado com outros sistemas de detecção, como amperométricos ou condutométricos, pode apresentar limites de detecção mais sensíveis, tendo em vista que outros métodos, onde foram aplicados estes sistemas de detecção, mostraram resultados com sensibilidade na ordem de  $\text{mmol.L}^{-1}$  [26]. A pré-concentração on-line também tem sido pesquisada por vários autores aumentando com êxito a sensibilidade em até 1000 vezes [27]. Nos estudos de Li Hai-Ling *et al* [28] foram verificados resultados eficientes em MEKC com surfactante aniônico. Por isso, em estudos subsequentes, esse método será otimizado quanto a detecção e pré-concentração.

#### 4 CONCLUSÃO

A aplicação do planejamento composto central aliado à função de Derringer e Suich se apresentaram como ferramentas muito eficientes para otimizar a resolução entre os 13 CHOs mais comuns em alimentos, como glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. A separação foi possível utilizando a cromatografia eletrocínica micelar, com eletrólito contendo  $132 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaOH (pH 12,8),  $23,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SOR e  $13,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SDS, capilar de  $50 \mu\text{m}$  por  $80 \text{ cm}$  de comprimento total,  $20 \text{ kV}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , injeção de  $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ , detecção em  $350 \text{ nm}$

(referência 275 nm). O método estudado apresentou potencial de separação entre analitos com características físico-químicas semelhantes, além de boa estabilidade dos tempos de migração. Em trabalhos futuros ainda pode ser otimizado quanto ao sistema de detecção utilizado.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FARIAS, F. F; NETO, U. F. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, v.8, 2004.

[2] FERREIRA, V. A. Obesidade e Pobreza: o Aparente Paradoxo. Revista ABESO - Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, a 6, 2006.

[3] CASTRO, A. G.P. de; FRANCO, L. J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 46, 2002.

[4] BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. Introdução à química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1989.

[5] LEE, Y.-H; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. Journal of Chromatography B, v. 681, p. 87-97, 1996.

- [6] COLLINS, C. H. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.
- [7] BASA, A.; MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T.; BARANSKI, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. *Journal of Chromatography A*, v. 1150, p. 312–319, 2007.
- [8] POPPE, H; XU, X., KOK, W.Th. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 716, p.231-240, 1995.
- [9] SILVA, J.A.F da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. *Química Nova*, v. 26, p 56-64, 2003.
- [10] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 363-373, 2001.
- [11] DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão Sobre Métodos de Análise. *Química Nova*, v. 30, p. 99-105, 2007.
- [12] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 20, p. 493-511, 1997.
- [13] MORALES, G. C. .; SIMONET, B. M.; CÁRDENAS, S. ; VALCÁRCEL, M. On-capillary sample cleanup method for the electrophoretic determination of carbohydrates in juice samples. *Electrophoresis*, v. 28,p. 1557–1563, 2007.

- [14] BAZZANELLA, K. B. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II). *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 283–288, 1998.
- [15] MOMENBEIK, F.; JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; HILDER, E. F. MACKA, M.; HADDAD, P. R. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. *Electrophoresis*, v. 27, p. 4039–4046, 2006.
- [16] CAO, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; JIANNONG, Y. Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 86, p. 131–136, 2004.
- [17] ZHANG, X.; CAO, Y.; YE, J. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 72, p. 385-388, 2001.
- [18] HU, Q.; ZHOU, T.; ZHANG, L., FANG, Y. Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Analyst*, v. 126, p. 298-301, 2001.
- [19] SOGA, T. e SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry*, v. 69, p. 339-344, 2000.

[20] SOGA, T.; HEIGER, D. N. Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 261, p. 73–78, 1998.

[21] ZEMANN, A. J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 243-251, 1997.

[22] JAGER A.V.; TAVARES M. F. M.; TONIN, F. G. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 586-594, 2007.

[23] BAO, Y.; NEWBURG, D. S; ZHU, L. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from Human Milk by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 370, p. 206–214, 2007.

[24] FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. *Capillary electrophoresis for food analysis: Method development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000.

[25] MEINHART, A. D; BALLUS, C. A.; BRUNS, R. E; GODOY, H.T. Otimização multivariada de seis diferentes metodologias para a separação de carboidratos em alimentos utilizando o método de Derringer e Suich na predição matemática das condições analíticas. Capítulo 4 da Tese de Doutorado, UNICAMP, SP, 2010.

[26] NOGUEIRA, T.; LAGO, C. L. do. Detection of adulterations in processed coffee with cereal and coffee husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 32, p. 3507-3511, 2005.

[27] MORAES, M. L. L. de; MORAES, S. de L.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. *Quimica Nova*, v. 32, p. 1041-1046, 2009.

[28] LI, H. L.; XU, H. B., GAO, Z. H. Determination of 3-Nitrotyrosine by Micellar Electrokinetic Chromatography with on-Column High-Salt Stacking. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 35, p. 1087-1091, 2007.

**CONCLUSÃO GERAL**

O método de eletroforese capilar de zona se mostrou eficiente na separação de 8 compostos (sacarose, lactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose) dentre os 13 estudados. Apresentou-se como uma boa alternativa para a análise de amostras como sucos, vinhos, arroz e café ou outras que não necessitem da separação de lactulose, epilactose, maltotriose, maltose e galactose.

Nos estudos univariados do método por MEKC com surfactante catiônico foi observada a separação dos mesmos compostos que o método por eletroforese capilar de zona. O uso de MEKC com surfactante aniônico apresentou a separação de 11 compostos, sendo observada a coeluição somente entre arabinose e manose.

Os estudos multivariados mostraram uma contribuição significativa para a avaliação minuciosa dos efeitos de interação que ocorrem entre as variáveis. Utilizando um planejamento composto central, contendo 17 experimentos, através do método por MEKC com tensoativo catiônico foi obtida a separação de 9 carboidratos. Foi observado que o aumento da resolução dos compostos foi significativo nos níveis maiores das variáveis, região essa onde as condições de separação não foram repetitivas. O sistema estudado permitiu a separação dos CHOs presentes em sucos (glicose, frutose e sacarose), vinho (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose) e outras matrizes que tenham esses conjuntos em sua composição. Nos níveis estudados, a separação

dos CHOs presentes em cereais, lácteos e café, por exemplo, não apresentaram separação adequada podendo induzir a quantificações somatórias.

A técnica de MEKC com uso de surfactante aniônico, aliada a otimização multivariada do pH, concentração do eletrólito e do surfactante, e à função de desejabilidade de Derringer e Suich para otimizar várias respostas simultâneas, mostrou bons resultados em separação e repetitividade. Dois planejamentos fatoriais foram realizados. No primeiro, onde foram utilizadas condições mais brandas de pH, não foi obtida a separação dos 13 compostos. No entanto, os modelos permitiram realizar a predição matemática das condições analíticas para obter as resoluções entre os compostos críticos presentes em 6 matrizes de alimentos. Assim, foram desenvolvidos 6 métodos distintos, empregados, respectivamente na separação de CHOs em leite condensado (lactose, lactulose, epilactose, galactose e glicose), farelo de arroz (glicose, arabinose, frutose e xilose), vinho tinto (sacarose, galactose, glicose, arabinose, frutose, xilose e ribose), café torrado e moído (galactose, glicose, arabinose, manose, frutose, xilose e ribose), suco de laranja (sacarose, glicose e frutose) e ainda cereais matinais (sacarose, lactose, lactulose, epilactose, maltotriose, maltose, galactose, glicose e frutose).

O deslocamento do planejamento fatorial para o uso de níveis maiores de pH conduziu à obtenção de 23 respostas simultâneas, sendo 19 de resoluções entre picos que coeluíram ou estiveram adjacentes e 4 sobre a estabilidade do sistema. A aplicação da função de Derringer e Suich se mostrou eficiente para a

obtenção da separação simultânea dos 13 CHOs: glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, lactulose, epilactose, arabinose, manose, maltose, xilose, ribose e maltotriose. A separação foi possível utilizando a cromatografia eletrocínética micelar, com eletrólito contendo  $132 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaOH (pH 12,8),  $23,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SOR e  $13,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SDS, capilar de  $50 \mu\text{m}$  por  $80 \text{ cm}$  de comprimento total,  $20 \text{ kV}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , injeção de  $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ , detecção em  $350 \text{ nm}$  (referência  $275 \text{ nm}$ ). O método apresentou boa estabilidade dos tempos de migração e ainda pode ser otimizado quanto ao sistema de detecção.