



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**FERNANDA RODRIGUES SPINELLI**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ  
EM SUCOS DE UVA**

**CAXIAS DO SUL**

**2013**



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA E GESTÃO VITIVINÍCOLA**

**FERNANDA RODRIGUES SPINELLI**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ  
EM SUCOS DE UVA**

Dissertação do Título de Mestre pela  
Universidade de Caxias do Sul.

Área de concentração: Biotecnologia e Gestão  
Vitivinícola

Orientadora: Dra. Regina Vanderlinde

Coorientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra

**CAXIAS DO SUL**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

S757v Spinelli, Fernanda Rodrigues  
Validação de métodos para detecção da adição de suco maçã em sucos de uva / Fernanda Rodrigues Spinelli, 2013.  
81 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.  
Orientação: Profª. Drª.: Regina Vanderlinde

1. Suco de uva. 2. Suco de maçã. 3. Biotecnologia. 4. Controle de qualidade. I. Título.

CDU : 663.236

Índice para catálogo sistemático:

1. Suco de uva	663.236
2. Suco de maçã	663.346
3. Biotecnologia	60
4. Controle de qualidade	658.56

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

FERNANDA RODRIGUES SPINELLI

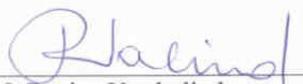
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ EM  
SUCOS DE UVA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em  
Biotecnologia e Gestão Vitivinícola da Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia e Gestão  
Vitivinícola.

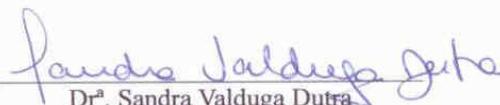
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Regina Vanderlinde

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Sandra Valduga Dutra

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE AGOSTO DE 2013.



Dr<sup>a</sup>. Regina Vanderlinde  
Orientadora



Dr<sup>a</sup>. Sandra Valduga Dutra  
Co-Orientadora



Dr<sup>a</sup>. Caroline Dani



Dr<sup>a</sup>. Luciani Tatsch Piemolini Barreto



Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

*As pessoas mais especiais da minha  
vida, meus queridos e inspirantes pais,  
Charles e Tânia, meu grande irmão,  
Fábio, e ao meu amor, Rodrigo Bonho.*

## AGRADECIMENTOS

O espaço limitado de agradecimentos não me permite agradecer como deveria a todas as pessoas que ao longo do meu mestrado me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação pessoal e acadêmica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, com profundo reconhecimento e agradecimento a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Aos meus pais que, pacientemente, sempre me deram enorme apoio e exemplo. Incentivaram-me a querer aprender mais, todos os dias, e a ter vontade constante de querer fazer melhor, além do carinho que me proporcionam que não encontro palavras para explicar.

Ao meu irmão, meu fiel escudeiro, grande companheiro de vida, pelo carinho, paciência, apoio, incentivo e amizade.

Ao meu amor, meu noivo, por estar sempre ao meu lado incondicionalmente, pela paciência, incentivo, carinho, admiração e companheirismo em busca dos nossos sonhos.

À professora Regina Vanderlinde pela oportunidade de ingressar no mestrado, orientação, confiança, amizade e incentivo desde o começo da faculdade.

À Dra. Sandra Valduga Dutra pela grande colaboração, ensinamentos, atenção, incentivo, confiança e amizade desde quando comecei como estagiária no LAREN.

À todos os colegas, amigos e estagiários do Laboratório de Referência Enológica, em especial à Jéssica Menegat pela ajuda na elaboração dos experimentos e realização das análises, à Ângela Rossi Marcon, Gilberto Carnieli, Susiane Leonardelli, Carlos Roani, Plínio Manosso e Vanessa Webber pelo apoio, colaboração, troca de conhecimentos, agradável convivência, momentos de descontração e amizade.

Ao corpo docente do curso pelos ensinamentos. À secretaria do curso, em especial a Sra. Cláudia Benatto, por estar sempre à disposição gentilmente para atender as dúvidas.

Aos professores Gabriel Pauletti, Sérgio Laguna Echeverrigaray e Aldo José Pinheiro Dillon, da Comissão de Acompanhamento e da Banca de Qualificação pelas correções, sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

As professoras Caroline Dani e Luciani Barreto por terem disponibilizado seu tempo e aceitado participarem da Banca Examinadora.

Aos essenciais amigos, que direta ou indiretamente participaram deste momento.

A empresa Tecnovin do Brasil Ltda pelo fornecimento das amostras de suco de uva e suco de maçã concentrados.

Ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) e à Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, pela disponibilidade dos equipamentos, materiais e instalações para realização deste trabalho.

## RESUMO

Devido ao aumento do consumo de sucos de uva, o controle da qualidade é uma realidade em todos os países produtores e consumidores desse produto. A forma mais comum de adulteração é através da substituição por suco de maçã. As amostras adulteradas podem ser identificadas através de análises específicas, pois o suco de maçã possui alguns compostos que a uva não apresenta ou possui pequenas quantidades, como a florizina e o sorbitol. Portanto, métodos analíticos capazes de identificar a composição de sucos de uva e determinar sua autenticidade são necessários para garantir um controle eficaz da qualidade dos sucos de uva. Por esta razão, o presente trabalho teve como objetivo validar os métodos analíticos da florizina e do sorbitol para detectar adição de suco de maçã em suco de uva. Inicialmente, foram validados os métodos para análise de florizina e sorbitol, realizados em cromatografia líquida. Após a validação dos métodos, foram realizados testes de adições de suco de maçã das cultivares Gala e Fuji em sucos de uva das cultivares Concord, Isabel e Bordô, e, foram analisados sucos de uva e maçã comerciais. Todos os sucos de uva que apresentaram concentração elevada de sorbitol também apresentaram concentração elevada de florizina. Através dos resultados deste estudo, observou-se que os métodos da florizina e do sorbitol são eficazes para detectar a adição de suco de maçã em suco de uva.

**Palavras-chaves:** suco de uva, suco de maçã, florizina, sorbitol, validação de métodos.

## **ABSTRACT**

Due to the increased consumption of grape juice, quality control is a reality in every country producers and consumers of this product. The most common form of adulteration is by substitution with apple juice. The adulterated samples can be identified by specific analyzes, as apple juice has some compounds that the grape does not have or has in small amounts, as phlorizin and sorbitol. Therefore, analytical methods capable of identifying the composition of grape juices and determine its authenticity are needed to ensure effective control of the quality of the grape juices. For this reason, the present study aimed to validate the analytical methods of phlorizin and sorbitol to detect addition of apple juice in grape juice. Initially, the methods were validated for the analysis of phlorizin and sorbitol, carried out in liquid chromatography. After validation of the methods, tests were conducted additions of apple juice cultivars Gala and Fuji in grape juices from cultivars Concord, Isabel and Bordô, and were analyzed grape and apple commercial juices. All grape juices show that high concentrations of sorbitol also showed high concentration of phlorizin. Through this study, it was observed that the methods of phlorizin and sorbitol are effective to detect the addition of apple juice grape juice.

**Keywords:** grape juice, apple juice, phlorizin, sorbitol, validation methods.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química dos ácidos benzóicos (a) e estrutura dos ácidos cinâmicos (b) .....	23
FIGURA 2 – Estrutura química dos flavonóides .....	24
FIGURA 3 – Estrutura química da florizina .....	26
FIGURA 4 – Estrutura química do sorbitol .....	28
FIGURA 5 – Curva analítica da florizina com e sem a matriz .....	44
FIGURA 6 – Distribuição dos resíduos da curva de calibração da florizina em água .....	46
FIGURA 7 – Concentração de florizina em suco de uva Concord adicionado de suco de maçã Gala e Fugi .....	51
FIGURA 8 – Concentração de florizina em suco de uva Isabel adicionado de suco de maçã Gala e Fugi .....	52
FIGURA 9 – Concentração de florizina em suco de uva Bordô adicionado de suco de maçã Gala e Fugi .....	52
FIGURA 10 – Relação entre a concentração de florizina e porcentagem de suco de maçã .....	53
FIGURA 11 – Curva analítica do sorbitol com e sem a matriz .....	54
FIGURA 12 – Distribuição dos resíduos da curva de calibração do sorbitol .....	55
FIGURA 13 – Concentração de sorbitol em suco de uva Concord adicionado de suco de maçã Gala e Fugi.....	61
FIGURA 14 – Concentração de sorbitol em suco de uva Isabel adicionado de suco de maçã Gala e Fugi .....	62
FIGURA 15 – Concentração de sorbitol em suco de uva Bordô adicionado de suco de maçã Gala e Fugi .....	62
FIGURA 16 – Relação entre a concentração de sorbitol e porcentagem de suco de maçã (Gala e Fugi) .....	63
FIGURA 17 – Relação entre a concentração de sorbitol e porcentagem de suco de maçã Gala...63	

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 – Critério de aceitação da precisão .....	34
QUADRO 2 – Critério de aceitação da exatidão .....	35

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Curva analítica da florizina em água .....	45
TABELA 2 – Concentração dos padrões de florizina x DPR .....	47
TABELA 3 – Concentração de florizina x recuperação média .....	48
TABELA 4 – Estabilidade do padrão de florizina de 60,00 mg.L <sup>-1</sup> .....	49
TABELA 5 – Concentração de florizina (mg.L <sup>-1</sup> ) em diferentes fluxos de análise .....	50
TABELA 6 – Concentração de florizina (mg.L <sup>-1</sup> ) em diferentes temperaturas de análise .....	50
TABELA 7 – Curva analítica do sorbitol em água .....	55
TABELA 8 – Concentração dos padrões de sorbitol x DPR.....	57
TABELA 9 – Concentração de sorbitol x recuperação média.....	58
TABELA 10 - Estabilidade do padrão de sorbitol de 50,00 mg.L <sup>-1</sup> .....	59
TABELA 11 – Concentração de sorbitol (mg.L <sup>-1</sup> ) em diferentes fluxos de análise .....	60
TABELA 12 - Concentração de sorbitol (mg.L <sup>-1</sup> ) em diferentes temperaturas de análise .....	60
TABELA 13 - Resultados de florizina e sorbitol em sucos de uva tintos comerciais e respectiva porcentagem de possível adição de suco de maçã .....	66
TABELA 14 - Número de amostras adulteradas considerando limite de 5 e 10 % de presença de suco de maçã .....	67
TABELA 15 - Resultados de florizina e sorbitol em sucos de maçã comerciais .....	68

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 SUCO DE UVA.....	17
<b>2.1.1 Cultivares utilizadas na elaboração de suco de uva no Brasil</b> .....	<b>17</b>
2.1.1.1 Cultivar Concord.....	18
2.1.1.2 Cultivar Isabel.....	18
2.1.1.3 Cultivar Bordô .....	19
2.2 SUCO DE MAÇÃ.....	19
<b>2.2.1 Cultivares utilizadas na elaboração de suco de maçã no Brasil</b> .....	<b>20</b>
2.2.1.1 Cultivar Gala.....	20
2.2.1.2 Cultivar Fuji.....	21
2.3 ADULTERAÇÕES EM SUCOS DE UVA.....	21
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	22
<b>2.4.1 Compostos fenólicos da uva e suco de uva</b> .....	<b>23</b>
2.4.1.1 Compostos não flavonóides .....	23
2.4.1.2 Compostos flavonóides .....	24
<b>2.4.2 Compostos fenólicos da maçã e suco de maçã</b> .....	<b>25</b>
2.4.2.1 Florizina .....	26
2.5 POLIÓIS .....	27
<b>2.5.1 Sorbitol</b> .....	<b>27</b>
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	29
<b>2.6.1 Seletividade</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6.2 Linearidade</b> .....	<b>31</b>
<b>2.6.3 Limite de Detecção (LD)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.4 Limite de Quantificação (LQ)</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6.5 Faixa de Trabalho</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.6 Precisão</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.7 Exatidão</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6.8 Estabilidade</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6.9 Robustez</b> .....	<b>36</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DA FLORIZINA E DO SORBITOL.....	37
<b>3.1.1 Seletividade</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.2 Linearidade</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.3 Limite de detecção</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.4 Limite de quantificação</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.5 Faixa de trabalho</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.6 Precisão</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.7 Exatidão</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.8 Estabilidade</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.9 Robustez</b> .....	<b>40</b>
3.2 AMOSTRAS.....	40
<b>3.2.1 Amostras utilizadas para a validação e aplicação dos métodos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2.2 Amostras de sucos comerciais</b> .....	<b>41</b>
3.3 MÉTODOS .....	41

<b>3.3.1 Reagentes e padrões</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3.2 Método para determinação da florizina</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.3 Método para determinação do sorbitol</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A FLORIZINA</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1.1 Seletividade</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1.2 Linearidade</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1.3 Limite de detecção</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.4 Limite de quantificação</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.5 Faixa de trabalho</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.6 Precisão</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.7 Exatidão</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1.8 Estabilidade</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1.9 Robustez</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2 ADIÇÕES DE SUCO DE MAÇÃ EM SUCO DE UVA (FLORIZINA)</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA O SORBITOL</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3.1 Seletividade</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3.2 Linearidade</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3.3 Limite de Quantificação</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3.4 Limite de Detecção</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3.5 Faixa de Trabalho</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.6 Precisão</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.7 Exatidão</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3.8 Estabilidade</b> .....	<b>58</b>
<b>4.3.9 Robustez</b> .....	<b>59</b>
<b>4.4 ADIÇÕES DE SUCO DE MAÇÃ EM SUCO DE UVA (SORBITOL)</b> .....	<b>61</b>
<b>4.5 ANÁLISE DE FLORIZINA E SORBITOL EM SUCOS COMERCIAIS</b> .....	<b>64</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da videira possui repercussão sócio-econômica de considerável expressão para a região Sul do Brasil. Uma das várias alternativas para o aproveitamento da uva é a elaboração de suco, cuja produção tem aumentado significativamente nos últimos anos. O suco de uva é uma bebida não fermentada elaborada principalmente com uvas das cultivares Concord, Isabel e Bordô que possuem as características de aroma e sabor apreciados pelos consumidores. O controle da qualidade dos sucos é uma realidade em todos os países produtores e consumidores, sendo que a forma mais comum de adulteração do suco de uva é através da mistura com outro suco, onde se destaca o suco de maçã.

A elaboração do suco de maçã é uma alternativa para aproveitar as frutas consideradas como descarte em função da disponibilidade de maçãs com baixo valor comercial que aumenta ano após ano devido ao aumento na produção nacional de maçãs. Em função desta grande quantidade de suco de maçã, existem adulterações de suco de uva através da adição de suco de maçã para aumentar o rendimento, o que normalmente não é perceptível na análise sensorial.

Entre os diferentes compostos que podem servir como auxiliares na identificação da adulteração do suco de uva com suco de maçã, encontram-se a florizina e o sorbitol. A florizina é o principal composto fenólico encontrado nas maçãs (representa 90% destes compostos), sendo que nas uvas, é ausente ou presente em pequenas quantidades. O sorbitol é um poliol, enquadrado no grupo dos glicídios, uma vez que é um álcool resultante do metabolismo dos açúcares. Também está presente em grandes quantidades no suco de maçã, e se encontra ausente ou em pequenas quantidades no suco de uva. Assim, a presença desses compostos no suco de uva poderia ser um indicador de adulteração.

Para a realização de análises de autenticidade em sucos de uva, são necessários métodos analíticos capazes de identificar a composição dos sucos garantindo um controle eficaz da qualidade dos sucos comerciais, além de promover a valorização destes produtos no mercado nacional e internacional. É de extrema importância que os resultados obtidos através das análises sejam emitidos com qualidade. A qualidade de um resultado laboratorial está vinculada à utilização de procedimentos como validação de métodos, controles internos de qualidade,

participação em programas de comparação interlaboratorial, uso adequado de materiais de referência certificados e atendimento aos requisitos de normas para reconhecimento.

Por esta razão, o presente trabalho teve como objetivo a validação de dois métodos analíticos: a determinação da florizina e do sorbitol, visando a detecção da adição de suco de maçã em suco de uva. Para tanto, inicialmente, os métodos foram validados, após foram realizadas curvas de acréscimos de suco de maçã em suco de uva e por fim, foram analisados sucos de uva e maçã comerciais. Estas metodologias serão disponibilizadas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para serem oficializadas no Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A viticultura brasileira iniciou com a chegada dos colonizadores portugueses, no século XVI. As primeiras videiras teriam sido trazidas por Martin Afonso de Souza, que as plantou na Capitania de São Vicente. Presume-se que eram vinhas adequadas para a produção de vinho (*Vitis vinifera*), originárias da Espanha e Portugal. O cultivo teria se espalhado por outras regiões, mas em 1789, um decreto protecionista promulgado por Portugal proibiu o plantio de uvas, inibindo completamente a produção e comercialização de vinho no Brasil. Permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país a partir de 1875 (IBRAVIN, 2013). A viticultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no sul do Brasil. Nos últimos anos, tem se tornado importante, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (DE MELLO, 2012).

Atualmente, a viticultura, no Brasil, ocupa uma área de, aproximadamente, 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país, até regiões situadas muito próximas ao equador. A produção de uvas é de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas/ano. Deste volume, cerca de 45% é destinado ao processamento, para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55% comercializado como uvas de mesa. Do total de produtos industrializados produzidos no Brasil, 77% são vinhos de mesa e 9% são sucos de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos diversos. Cerca de 13% são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante dos produtos industrializados, 1% do total, são outros derivados da uva e do vinho (IBRAVIN, 2013).

A determinação da qualidade e autenticidade dos sucos de frutas tem importante impacto para a indústria em termos de segurança alimentar e proteção ao consumidor (VEDEANU et al. 2012). Embora não constitua um problema de saúde pública, trata-se de uma deslealdade comercial e engano ao consumidor (SILVA et al. 1999).

## 2.1 SUCO DE UVA

O suco de uva é a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura, sendo tolerada graduação alcoólica de até 0,5° G.L. (BRASIL, 1990). Nutricionalmente, o suco de uva é comparado com a própria uva, pois na sua composição estão todos os constituintes principais tais como açúcares, minerais, ácidos, vitaminas e compostos fenólicos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

A tecnologia de elaboração utilizada, principalmente no que se refere à temperatura e tempo de extração, regula a solubilidade e a intensidade de difusão das substâncias contidas na película para o mosto, exercendo influência marcante na composição química e na tipicidade do produto final. Além da água, constituinte quantitativamente mais importante, o suco de uva possui elevado teor de açúcar, que lhe garante sabor doce e lhe atribui característica de bebida energética. Os dois açúcares do suco de uva são a glicose e a frutose, em partes aproximadamente iguais (RIZZON, MANFROI, MENEGUZZO, 1998).

A comercialização de suco de uva pronto para consumo no Rio Grande do Sul apresentou um grande aumento nos últimos anos. Em 2007, a comercialização de suco de uva no mercado interno e externo, foi de 37.563.837 litros. Em 2012, foi de 85.420.226 litros, representando um aumento em torno de 127% (UVIBRA, 2013). Em relação ao suco de uva concentrado, a comercialização em 2007 foi 19.049.429 Kg passando para 31.588.022 Kg em 2012, representando um aumento de aproximadamente 65,82% (IBRAVIN, 2013).

### 2.1.1 Cultivares utilizadas na elaboração de suco de uva no Brasil

Entre as cultivares destinadas à elaboração de sucos de uva no Brasil, destacam-se três da espécie *Vitis labrusca*, a Concord, a Isabel e a Bordô (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Os sucos destas cultivares complementam-se entre si, originando um produto final de reconhecida qualidade (CAMARGO; MAIA, 2004).

#### 2.1.1.1 Cultivar Concord

Também conhecida por Bergerac, Francesa e Francesa Preta. Trata-se de uma uva muito difundida nos Estados Unidos. Além do suco, é cultivada também para produção de uva de mesa e vinho (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). É a uva tinta referência de qualidade para suco pelas suas características de aroma e sabor. É uma cultivar de alta rusticidade, muito cultivada nos Estados do Sul, onde normalmente é plantada em pé-franco e, muitas vezes, dispensando tratamentos com fungicidas. Apresenta dificuldade de adaptação em regiões tropicais, sendo recomendada apenas para regiões onde existe um período de repouso definido. É relativamente precoce, medianamente vigorosa e bastante produtiva quando bem manejada (EMPRAPA, 2005).

#### 2.1.1.2 Cultivar Isabel

Também conhecida pelo nome de Americana e Nacional, além de Frutilla, no Uruguai e Fragola na Itália (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). É uma cultivar de uva tinta, muito rústica e altamente fértil, proporcionando colheitas abundantes com poucas intervenções de manejo. Tem o sabor característico das labruscas, adaptando-se a todos os usos: é consumida como uva de mesa; usada para a elaboração de vinhos branco, rosado e tinto, os quais, muitas vezes, são utilizados para a destilação ou para a elaboração de vinagre; origina suco de boa qualidade; pode ser matéria-prima para a elaboração de doces e geleias. É a cultivar mais plantada no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. A cultivar Isabel origina suco de menor intensidade aromática e cor, em relação ao suco da cultivar Concord (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Por essa razão, normalmente os produtos elaborados com uvas da cultivar Isabel precisam ser mesclados com vinho ou suco de cultivares tintórias para obtenção de produtos com a intensidade de coloração que o mercado exige (EMBRAPA, 2005).

### 2.1.1.3 Cultivar Bordô

Esta cultivar foi selecionada por Henry Ives nos Estados Unidos, em 1840. Seu nome original é Ives ou Ives Seedling, porém, no Brasil é conhecida por nomes regionais, 'Bordô' no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina; 'Terci' no Paraná; 'Folha de Figo' em Minas Gerais (GIOVANNINI, 2008). Esta cultivar de uva tinta tem importância comercial só em regiões com inverno definido, apresentando grande dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. Assim, a recomendação de cultivo desta cultivar está restrita aos pólos do Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná, além dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. É uma cultivar muito rústica e resistente a doenças fúngicas, normalmente plantada em pé-franco. A uva apresenta alta concentração de matéria corante, motivo principal de sua significativa difusão. Origina vinhos e sucos de cor intensa que, em cortes, servem para a melhoria da cor dos produtos à base de Isabel e de Concord (EMBRAPA, 2005).

## 2.2 SUCO DE MAÇÃ

A produção de maçã no mundo teve um aumento gradual desde a segunda guerra mundial. Este aumento ocorreu principalmente devido aos métodos de produção mais intensivos, que levaram a uma redução do número de pomares, entretanto levando ao aumento das suas áreas e conseqüente aumento da produção (BALBI, 2009).

Dentre as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, a maçã apresentou grande expansão de produção nos últimos anos. Ela se destina principalmente ao consumo *in natura*, porém, uma grande quantidade é processada industrialmente para elaboração de sucos, cidras, geleias e produtos desidratados (FROMM et al. 2012).

A agroindústria da maçã, no Brasil, utiliza como matéria-prima frutas de descarte provenientes dos processos de seleção para o mercado de frutas *in natura*. O descarte pode representar 30% da produção total. Essas frutas apresentam características que as tornam sem valor comercial, como, formato ruim, tamanho pequeno, coloração desuniforme, cicatrizes provenientes de insetos, pássaros ou ferimentos resultantes de tratamentos culturais e transportes

inadequados, assim como sintomas de doenças (manchas de sarna e de podridões) e problemas fisiológicos (PAGANINI et al. 2004).

O suco é um subproduto a ser considerado, pois é uma importante alternativa em função da disponibilidade de maçãs com baixo valor comercial (muitas vezes frutas de descarte) cujo volume total aumenta anualmente com a crescente produção nacional (NOGUEIRA et al. 2006).

Em países europeus, entretanto, tanto para a obtenção de sucos quanto para sidras, são utilizadas frutas de cultivares selecionadas para tal fim, sendo usados como marcadores de qualidade industrial os teores de acidez, taninos e açúcares. Esses componentes são importantes para a qualidade do produto e envolvem os critérios de cor, sabor e aroma, atributos envolvidos no processo de compra e no hábito dos consumidores (PAGANINI et al. 2004).

### **2.2.1 Cultivares utilizadas na elaboração de suco de maçã no Brasil**

A maçã usualmente cultivada é um híbrido interespecífico complexo, denominado *Malus domestica* (BALBI, 2009). Na safra 2010/2011 foram produzidos no Rio Grande do Sul 422.766 toneladas de maçã, na safra de 2011/2012 a produção aumentou para 483.009, representando um aumento de 14,25 % na produção. Na safra de 2011/2012, as cultivares Gala e Fugi representaram 93,53% da produção de maçãs no Rio Grande do Sul, com predominância da cultivar Gala com 62,67% (AGAPOMI, 2012).

No Rio Grande do Sul, a distribuição da área cultivada com macieiras no período de 2002 a 2009 também evidenciou o predomínio das cultivares Gala e Fugi. Estas cultivares possuem qualidades organolépticas que agradam plenamente o paladar do consumidor brasileiro e, por isso, constituíram-se naturalmente, nas principais opções de cultivo (FIARANÇO, 2010).

#### **2.2.1.1 Cultivar Gala**

A cultivar Gala procede do cruzamento entre ‘Kidd’s Orange Red’ x ‘Golden Delicious’, realizado em 1934, na Nova Zelândia. Em 1962, recebeu o nome Gala e em 1965 foi autorizado seu plantio em escala comercial. A partir de meados da década de 1970, tornou-se uma cultivar

muito popular. O fruto é pequeno à médio, uniforme, com excelente qualidade organoléptica (FIARANÇO, 2010).

No Rio Grande do Sul, na safra de 2011/2012 foram produzidas 302.697 toneladas de maçã da cultivar Gala. Em relação à safra de 2010/2011, houve um aumento de 9,87% na produção (AGAPOMI, 2012).

#### 2.2.1.2 Cultivar Fugi

Precede de um cruzamento de ‘Ralls Janet’ x ‘Delicious’, denominada ‘Fugi’ em 1962, introduzida no Brasil em 1967. Os frutos são de tamanho médio a grande e desuniformes. Possuem excelente qualidade organoléptica (FIARAVANÇO, 2010). A colheita se dá em abril, e é a cultivar mais resistente para frigoconservação (DE MELLO, 2004).

No Rio Grande do Sul, na safra de 2011/2012 foram produzidas 149.186 toneladas de maçã da cultivar Fugi, representando 30,89% do total das cultivares. Em relação a safra de 2010/2011, houve um aumento de 26,95% na produção (AGAPOMI, 2012).

### 2.3 ADULTERAÇÕES EM SUCOS DE UVA

A adulteração de produtos alimentares pode consistir na substituição de constituintes de elevado custo por outros menos dispendiosos, na omissão de algum componente e/ou na adição de determinados ingredientes. No que diz respeito aos derivados de frutos, as adulterações mais frequentes são a adição de água, açúcares e frutos de valor comercial inferior (SILVA et al. 1999).

O combate à adulteração de bebidas constitui grande desafio para o mercado mundial. A adulteração em bebidas não alcoólicas à base de frutas representa um dos temas mais estudado na área da tecnologia de bebidas (FIGUEIRA et al. 2010). A forma mais comum de adulteração dos sucos de frutas, por exemplo, é realizada através da substituição por outro suco de valor comercial inferior. As amostras adulteradas podem ser identificadas se a sua composição química

é significativamente diferente da composição observada em amostras genuínas (THAVARAJAH; LOW, 2006).

Fitelson (1970) concluiu a partir da presença de grandes quantidades de sacarose em suco concentrado de maçã e de sorbitol e sacarose em sucos concentrados de morango e amora preta, que estes sucos estavam adulterados. Koeppen (1974) identificou a adulteração em suco de pera devido à baixa quantidade de sorbitol e alto conteúdo de glicose. O sorbitol, poliol encontrado em grandes quantidades no suco de maçã (FLANZY, 2003), permite, segundo Fuleki e Pelayo (1993), detectar a adulteração de sucos de uva através da adição de suco de maçã cujo valor comercial é menor.

Como os sucos de uva são uma fonte importante de compostos fenólicos, muitas pessoas estão se conscientizando da importância do seu consumo na dieta diária (IFOAM, 2005). Entre os diferentes compostos que podem servir como marcadores inequívocos em sucos de frutas, vinhos e outras bebidas, os compostos fenólicos são potencialmente úteis por sua especificidade e multiplicidade (SCHIEBER et al. 2001).

## 2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Do ponto de vista químico, são caracterizados por um núcleo benzênico com um ou vários grupos hidroxilas (SHAHIDI; NACZK, 1995; FLANZY, 2003; ANGELO; JORGE, 2007). Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais, podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007). Sua classificação está baseada na distinção entre compostos não flavonoides e flavonoides (BONAGA et al. 1990; FLANZY, 2003).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Uma das razões da importância dos compostos fenólicos é devido a sua contribuição na

qualidade sensorial das frutas (cor, adstringência, acidez e aroma), além de alguns apresentarem importantes propriedades farmacológicas (VERSARI et al. 1997).

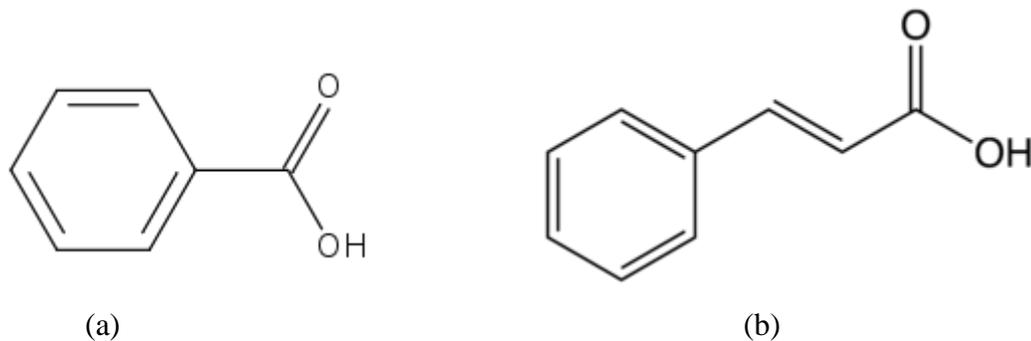
#### 2.4.1 Compostos fenólicos da uva e suco de uva

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos (MALACRIDA, MOTTA, 2005). Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência e estrutura dos sucos de uva (SANTANA et al. 2008) e classificam-se em compostos não flavonóides e compostos flavonóides.

##### 2.4.1.1 Compostos não flavonóides

Neste grupo encontram-se os ácidos fenólicos, divididos em ácidos benzóicos (C6-C1) (Figura 1a) e ácidos cinâmicos, portadores de uma cadeia lateral insaturada (C6-C3) (Figura 1b), além de outros derivados fenólicos como os estilbenos (FLANZY, 2003). Nos sucos de uva, os compostos fenólicos existentes são principalmente os não flavonóides (CABRITA; SILVA; LAUREANO, 2003). Os estilbenos mais importantes em relação à atividade antioxidante no suco de uva, são o resveratrol e o piceid, fitoalexinas que apresentam propriedades biológicas benéficas, presente em videiras e produzida também por um grande número de plantas (FLANZY, 2003; TRÍSKA, HOUŠKA, 2012). Dani et al. (2007) confirmam a presença de compostos não-flavonóides nos sucos de uva, que possuem poder antioxidante e são fontes nutricionais.

FIGURA 1 – Estrutura química dos ácidos benzóicos (a) e estrutura dos ácidos cinâmicos (b)



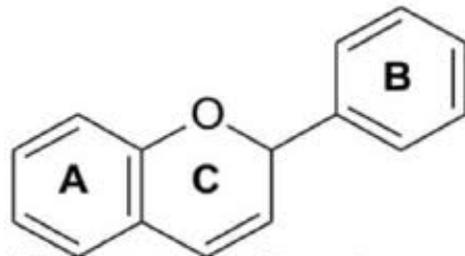
#### 2.4.1.2 Compostos flavonóides

Os flavonóides representam o grupo fenólico mais importante entre os produtos de origem natural. Nas plantas, eles exercem funções de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias (SIMÕES et al. 2001).

Os flavonóides são caracterizados por um esqueleto de base de quinze átomos de carbono (C6-C3-C6) do tipo 2-fenil benzopirona (Figura 2). Este grupo é dividido em várias subclasses que se diferem pelo grau de oxidação do seu núcleo pirano. Os flavonóides estão principalmente representados na uva pelos flavonóis, enquanto que os flavonóides em sentido amplo compreendem igualmente os antocianos e os 3-flavanóis. Encontram-se também na uva outros grupos de menor importância, como os dihidroflavonóis e as flavonas (FLANZY, 2003). Dani et al. (2007) confirmam a presença de compostos flavonóides nos sucos de uva. (antocianinas, catequinas, epicatequinas e procianidinas).

A concentração de flavonóides nas plantas é influenciada pela exposição ao raios ultravioleta, pelo clima, pela cultivar da planta e pelo estágio de maturação dos frutos (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Os flavonóis são pigmentos de coloração amarela, encontrados em maior quantidade na película de uvas tintas e brancas em relação aos flavanóis, que estão em menor quantidade e apresentam coloração mais "pálida". O principal flavonol identificado nas uvas e nos vinhos é o di-hidróxi-quercitina (taxifolina) (RIBERÉAU-GAYON et al. 2003).

FIGURA 2 – Estrutura química dos flavonóides.



### 2.4.2 Compostos fenólicos da maçã e suco de maçã

A composição fenólica das maçãs consiste em quatro classes: os ácidos cinâmicos tais como ésteres do ácido quínico dos ácidos cafeico e cumárico, flavanóis como glicosídeo de quercitina, dihidrochalconas como florizina e 3-flavonóis (que se apresentam tanto na forma monomérica (epicatequina, catequina) quanto na forma oligomérica ou também em forma polimérica, as procianidinas) (VAN BUREN; DE VOS; PILNIK, 1976; WILSON, 1981; LEA, 1982; DICK et al. 1987; OLESZEK et al. 1988; SPANOS; WROLSTAD, 1990; LANCASTER, 1992; NICOLAS et al. 1994; KERMASHA et al. 1995; FROMM et al. 2012).

Os flavonóides que se encontram em maior quantidade na maçã, são os flavonóis, os flavanóis, a florizina (polifenol característico da maçã) e as antocianinas, sendo que o ácido fenólico mais abundante na maçã é o ácido clorogênico (AWAD; DE JAQUER; WESTING, 2000). No entanto, a quantidade de cada um destes compostos, assim como a sua distribuição, depende de fatores como a disponibilidade de nutrientes, radiação solar e temperatura, além do estado de maturação da fruta e do seu contexto genético (SAURE, 1990; TREUTTER, 2001, JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003). Segundo Treutter (2001), muitas das enzimas responsáveis pela síntese de flavonóides são induzidas pela exposição à luz.

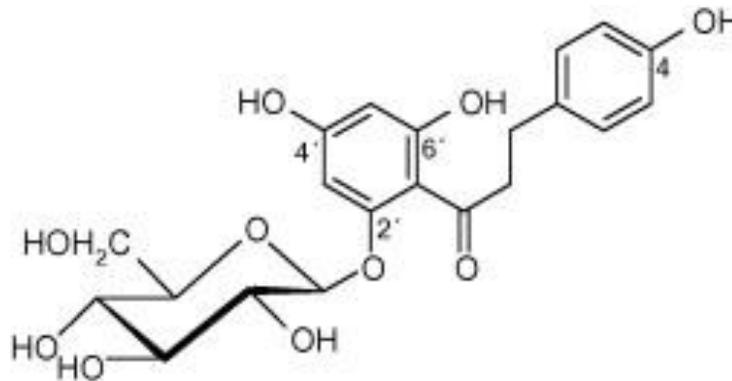
Os compostos fenólicos são importantes constituintes da maçã (fruta fresca) e dos produtos processados, como o suco (OLESZEK et al. 1988), a polpa (SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001), fermentados e sidras. Estes compostos apresentam considerável interesse tecnológico devido a sua influência nas características sensoriais do produto final (cor, sabores amargo e adstringente, aroma, entre outros) (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

Os compostos fenólicos localizam-se nos vacúolos (97%), sendo que nas células da epiderme e sub-epiderme, as concentrações são superiores às quantidades dos tecidos internos. Em diferentes cultivares, a relação casca/polpa de concentração de fenóis pode ser de 3 a 10 vezes superior (NICOLAS et al. 1994). Entre os compostos fenólicos da maçã, a florizina encontra-se em maior concentração (FROMM et al. 2012).

### 2.4.2.1 Florizina

A florizina é um composto fenólico que tem sido amplamente utilizado para identificar adulteração de sucos de frutas e outros produtos (SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001). A florizina (Figura 3) é o principal glicosídeo fenólico encontrado nas sementes das maçãs e tem sido associada com a dormência das sementes (GROCHOWSKA, 1966; JHAM, 1996). É encontrada também na polpa e na casca, porém na casca em maior concentração (VAN DER SLUIS et al. 2001). A florizina possui esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> com um radical β-d-glucopiranosose ligado na posição 2 (GOSCH; HALBWIRTH; STICH, 2010).

FIGURA 3 – Estrutura química da florizina



A florizina representa mais de 90% dos compostos fenólicos solúveis encontrados nas folhas da maçã. É encontrada em mais de trinta famílias de plantas, porém, a maçã possui quantidades superiores quando comparada a outras espécies (DONG et al. 2007; GOSCH; HALBWIRTH; STICH, 2010), sendo considerada característica das maçãs e de seus derivados (suco de maçã, cidra, entre outros).

A análise da florizina tem sido sugerida como uma técnica para monitorar adulteração de alguns produtos. O conteúdo nas maçãs varia conforme a cultivar (BURDA; OLESZEK; LEE, 1990; AMIOT et al. 1992). Delage et al. (1991) relatam valores entre 3 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de florizina em sucos de maçã experimentais, e 26,0 mg.L<sup>-1</sup> em sucos de maçã comerciais. O conteúdo de florizina em sucos comerciais de maçã pode ser até 10 vezes maior que em sucos experimentais

(elaborados em extrator), isto acontece pois no processo industrial é extraída toda a maçã (folhas, casca e semente) além do uso de tratamentos térmicos que inativam enzimas diretamente ou indiretamente estão relacionados a degradação da florizina em sucos caseiros (HERNANDEZ et al. 1997), o que está de acordo com os resultados de Versari et al. (1997) que relataram valores superiores de florizina em sucos de maçã comerciais quando comparados aos sucos caseiros.

Em estudo da composição do suco de maçã realizado por Eisele e Drake (2005), eles observaram florizina em todas as amostras (175 variedades).

De Simon et al. (1992) analisaram compostos fenólicos e não fenólicos em sucos e néctars comerciais de laranja, maçã, abacaxi, pêssego, pera, damasco e uva. Através deste estudo, identificaram que a florizina é típica da maçã pois apresentou maiores concentrações nas amostras de maçã, permitindo a detecção de maçã em sucos misturados, como foi identificado em uma amostra de suco de pera.

## 2.5 POLIÓIS

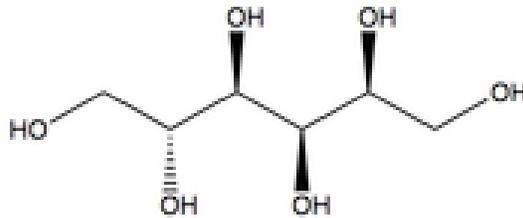
Os polióis são compostos que participam do poder edulcorante dos mostos e vinhos. A maior parte deles não se encontram nas uvas e mostos procedentes de uvas sãs. Alguns polióis são formados pelas leveduras ou bactérias durante a fermentação. O estado sanitário das uvas tem grande influência na concentração de polióis, que aumenta em função da podridão da uva (FLANZY, 2003). Os polióis se caracterizam pela presença de vários radicais (hidroxilas) juntos em uma mesma molécula (RIBÉREAU-GAYON et al. 2003). Entre os polióis, encontra-se o sorbitol, o poliol mais amplamente encontrado na natureza (VIGGIANO, 2003).

### 2.5.1 Sorbitol

O sorbitol (também chamado de glucitol) (Figura 4) é isômero do manitol (RIBÉREAU-GAYON et al. 2003). Não sendo, propriamente, um açúcar, é, em termos analíticos, enquadrado no grupo dos glicídios uma vez que é um álcool resultante do metabolismo dos açúcares e é

edulcorante (SILVA et al. 1999). É um aditivo utilizado em alimentos (como adoçante), em chocolates, doces, geleias para diabéticos, entre outros, porém, não é um aditivo permitido em vinhos (WROLSTAD; SHALLENBERGER, 1981). A sua quantificação pode ser bastante útil na detecção de adulterações, uma vez que em alguns frutos está ausente, ou presente em pequenas quantidades, enquanto que em outros existe em concentrações mais elevadas (WROLSTAD; SHALLENBERGER, 1981; VAN GORSEL et al. 1992).

FIGURA 4 – Estrutura química do sorbitol



O sorbitol é o principal poliol produzido pela família das Rosáceas (LI; FENG; CHENG, 2012), está presente em diversas frutas (maçã, pera, cereja, ameixa, amêndoas, pêssego e melão), porém está ausente nas uvas sãs (WROLSTAD; SHALLENBERGER, 1981; FLANZY, 2003; RIBÉREAU-GAYON et al. 2003; SORIA-GUERRA et al. 2011). Quantidades superiores de sorbitol indicam mistura de sucos ou fermentados de maçã, pera e cereja as quais são ricas em sorbitol (RIBÉREAU-GAYON et al. 2003).

Este poliol é solúvel em água, cristalino e de sabor doce (JONAS; SILVEIRA, 2004). Obtido industrialmente através da hidrólise do amido seguida de hidrogenação catalítica da D-glucose, sendo comercializado na forma de xarope (70%) ou em pó. Apresenta poder espessante, edulcorante, inibidor de cristalização e anticongelante. Apresenta doçura de 0,5 a 0,7 em relação à sacarose e efeito refrescante na boca, sem sabor residual. Em associação com outros edulcorantes, como sacarina e ciclamato, mascara seu sabor residual (VIGGIANO, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que o stress abiótico induz o acúmulo de sorbitol na maçã (LI et al. 2012). Na uva, o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* aumenta os níveis de sorbitol (SPONHOLZ; LACHER; DITTRICH, 1986; FLANZY, 2003; RIBÉREAU-GAYON et al. 2003), a fermentação alcoólica normalmente permite a formação de aproximadamente 30 mg.L<sup>-1</sup> e as bactérias lácticas não o formam (RIBÉREAU-GAYON et al. 2003).

Este poliol foi objetivo de atenção de pesquisadores da Sub-comissão de Métodos de Análises da OIV de 1977, por ser considerado sinônimo de fraude devido a adição de suco de maçã ao mosto, e, de cidra ao vinho. O estado sanitário das uvas tem grande influência nas concentrações dos diferentes polióis, que aumentam em função da podridão da uva (FLANZY, 2003).

Silva et al. (1999) não observaram teores detectáveis de sorbitol no suco de uva, enquanto que o suco de pera apresentou a maior quantidade deste composto. Assim, concluíram que a presença de sorbitol em sucos de uva é um indicador de adulteração.

Dennis, Massey e Bigwood (1994), analisaram sorbitol em vinhos provenientes de 12 países diferentes, comercializados no Reino Unido. A maior parte destes vinhos continham até 200,0 mg.L<sup>-1</sup> de sorbitol, porém em alguns vinhos foram observados valores de até 600,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Burda e Collins (1991) analisaram sorbitol em cento e trinta e nove vinhos australianos, incluindo os vinhos brancos e tintos, porto, xerez e moscatéis, com o objetivo de detectar adulteração de vinho com suco de maçã. Estes autores encontraram dez vinhos adulterados com valores de sorbitol na faixa de 3400,0 a 6700,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Segundo Fuleki e Pelayo (1993), quantidades traços de sorbitol são encontradas nas uvas, porém, no estudo realizado por estes autores, onde analisaram sucos de uva caseiros e comerciais, não encontraram sorbitol em nenhuma das amostras analisadas. Nos sucos de maçã analisados os valores de sorbitol que eles encontraram variou entre 1600,0 a 16700,0 mg.L<sup>-1</sup>. Em suco de uva branco experimental, Pilando e Wrolstad (1992) não observaram conteúdo de sorbitol.

## 2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de avaliar a qualidade dos resultados das medições através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo exigida por órgãos reguladores. Para evitar ou minimizar situações que levem a questionamentos futuros em relação a resultados analíticos fornecidos, é imprescindível a realização de experimentos de validação e o registro dos dados obtidos durante todo o processo de desenvolvimento do método analítico (BRITO et al. 2003).

Entende-se por validação de um método analítico o processo que demonstra que o método analítico é apropriado para o propósito para o qual foi utilizado. É definida como o estabelecimento de evidências experimentais documentadas que fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um resultado que atenderá às características e especificações de qualidade (RIBANI et al. 2004).

A validação de métodos analíticos é um dos fatores importantes às todas atividades de química analítica e um requisito fundamental no sistema da qualidade de laboratórios que realizam análises. Na validação de um método é necessário considerar todas as fontes de incerteza associada à medição (SCAPIN et al. 2005).

Os parâmetros de validação usualmente testados são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade, robustez, entre outros (LANÇAS, 2004; NBR ISO/IEC 17025, 2005; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011; AOAC, 2012).

### 2.6.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra e de suas impurezas. A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, que podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito pode depender da concentração (INMETRO, 2011).

Para avaliar a seletividade dos métodos, são realizadas curvas analíticas (com no mínimo seis concentrações) através da adição da substância de interesse (padrão) na matriz (produto a ser analisado) e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz (água).

Após a obtenção dos resultados das concentrações de cada curva, deve ser aplicado o teste F para analisar a variância e verificar se apresentam diferenças significativas entre elas. Para aplicar o teste F, primeiro é determinado o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (comparando a variância média dos valores das diferenças das duas curvas):

$$F_{\text{calculado}} = \text{Variância}_{(\text{maior})} / \text{Variância}_{(\text{menor})} \quad (1)$$

Após a obtenção do  $F_{\text{calculado}}$ , o resultado é comparado com o  $F_{\text{tabelado}}$  (determinado a partir da tabela de distribuição F, ANEXO A). Se o  $F_{\text{calculado}}$  for menor do que o  $F_{\text{tabelado}}$ , a precisão das duas curvas, com diferentes matrizes, não possui diferença significativa (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

### 2.6.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (SILVA; ALVES, 2006).

É obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

sendo:

$y$  = resposta medida (área do pico)

$x$  = concentração

$a$  = intersecção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$

$b$  = inclinação da curva analítica = sensibilidade

A linearidade pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação de regressão linear (INMETRO, 2011). Devem ser mencionados os intervalos de aceitação dos parâmetros da curva, como por exemplo  $R^2 > 0,99$  (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Para verificar a eficiência da equação de regressão linear, pode ser construído e analisado o gráfico de resíduos. O gráfico de resíduos ilustra uma distribuição dos resultados em torno da linha reta central. Se esta distribuição for aleatória, confirma a linearidade do método. Além disso, o gráfico também permite observar o comportamento das variâncias de uma curva de calibração com o aumento da concentração.

### 2.6.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (SILVA; ALVES, 2006). É a indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2011).

O cálculo do limite de detecção é realizado da seguinte maneira:

São analisadas 7 alíquotas da amostra branco, tendo assim 6 graus de liberdade (7-1) e então é aplicada a seguinte fórmula:

$$LD = \bar{X} + t(n-1, 1-\alpha).S \quad (2)$$

Onde,  $\bar{X}$  = média dos valores dos brancos da amostra;  $t$  = distribuição de Student (Anexo B), dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e  $S$  = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

### 2.6.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa o menor valor determinado com confiabilidade analítica, em que o analito esteja dentro da sensibilidade normal do equipamento ou da técnica (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). O limite de quantificação é calculado da seguinte maneira: são analisadas 7 alíquotas da amostra branco, tendo assim 6 graus de liberdade (7-1). Após é aplicada a seguinte fórmula:

$$LQ = \bar{X} + 10.S \quad (3)$$

Onde,  $\bar{X}$  = média dos valores dos brancos da amostra e  $S$  = desvio-padrão amostral dos brancos (INMETRO, 2011).

### 2.6.5 Faixa de Trabalho

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. Todo experimento de determinação da faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

### 2.6.6 Precisão

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos e quanto menor for a amplitude das medidas, maior será a precisão (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Normalmente é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e o coeficiente de variação (CV, expresso em %). O CV também é conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma (INMETRO, 2011):

$$C.V. = DPR = (DP / CMD) * 100 \quad (4)$$

Onde,  $DP$  = desvio-padrão e  $CMD$  = concentração média determinada.

O critério de aceitação para precisão, segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012), encontra-se no Quadro 1, que leva em consideração a concentração do analito na amostra.

Quadro 1 - Critério de aceitação da precisão.

Concentração	DPR (%)
100%	1,3
10%	1,9
1%	2,7
0,10%	3,7
100 ppm	5,3
10 ppm	7,3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

Fonte: AOAC (2012).

### 2.6.7 Exatidão

A exatidão pode ser definida como a tendência em apresentar resultado maior ou menor que o valor real, indicando a existência ou não de erro sistemático (média que resultaria de um infinito número de medições do mesmo mensurando menos o valor verdadeiro do mensurando), que pode ser expresso pelo Desvio Absoluto (DA):

$$CV(\%) = (S / \bar{X}) * 100 \quad (5)$$

A determinação da exatidão pode ser feita de diversas formas: analisando uma amostra de concentração conhecida (padrão) e comparando o resultado ao valor verdadeiro; comparando os resultados da análise do método a ser avaliado ao resultado obtido por um método de exatidão conhecida; fortificando uma matriz branca com analito e calculando a taxa de recuperação das quantidades conhecidas de analito (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). O critério de aceitação para exatidão, segundo a AOAC, encontra-se na Quadro 2.

Quadro 2 - Critério de aceitação da exatidão.

Concentração	Recuperação média (%)
100%	98 - 102
10%	98 - 102
1%	97 - 103
0,10%	95 - 105
100 ppm	90 - 107
10 ppm	80 - 110
1 ppm	80 - 110
100 ppb	80 - 110
10 ppb	60 - 115
1 ppb	40 - 120

Fonte: AOAC (2012).

### 2.6.8 Estabilidade

A estabilidade do analito deve ser determinada de modo a reproduzir as reais condições de armazenamento, manuseio e análise. Está relacionada a variação de uma característica em um determinado período de tempo (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Dependendo do analito da matriz e do objetivo do estudo, as condições de avaliação da estabilidade dos analitos podem ser melhor ajustadas (LANÇAS, 2004).

Para o estudo da estabilidade, deve-se elaborar uma solução da substância a ser avaliada e determinar o teor do analito. Transferir a solução para recipientes apropriados, rotulá-los e armazená-los. Em cada alíquota determinar o teor do analito com o ensaio previamente estabelecido a ser validado. O tempo de armazenamento da solução pode ser o tempo necessário para observar degradações. Deve-se calcular a concentração do analito no momento 'i' ( $C_i$ ) da análise, através da fórmula (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009):

$$\text{Substância a analisar restante (\%)} = C_i * (100/C_{\text{fresca}})$$

Onde,  $C_{\text{fresca}}$  = concentração da solução fresca.

### 2.6.9 Robustez

A robustez é definida como a suscetibilidade de um método analítico em responder a pequenas alterações das condições experimentais, as quais podem ser condições de armazenamento, ambientais, diferentes preparações da amostra ou outras pequenas alterações. (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

No caso da cromatografia, os vários parâmetros experimentais, como temperatura da coluna, fluxo e composição da fase móvel, entre outros, devem ser variados dentro de uma faixa de valores realista, a variação da resposta deve ser conhecida. Assim, pode-se especificar a faixa de tolerância para cada parâmetro do método dentro do qual o mesmo é considerado robusto (LANÇAS, 2004).

A robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em  $\pm 2\%$ , o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al. 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A validação dos métodos e as análises dos sucos foram realizados no Laboratório de Referência Enológica – LAREN da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul (SEAPA) vinculado ao Instituto Brasileiro do Vinho – IBRAVIN, localizado em Caxias do Sul.

#### 3.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DA FLORIZINA E DO SORBITOL

Os métodos para análise de florizina e sorbitol foram validados conforme o procedimento do LANÇAS (2004), NBR ISO/IEC 17025 (2005), ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ (2009), INMETRO (2011) e AOAC (2012). Os parâmetros de validação foram realizados na seguinte ordem: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

##### 3.1.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade dos métodos da florizina e do sorbitol, foram realizadas duas curvas analíticas para cada método, uma curva com adições crescentes de padrão na água (branco, sem a presença da matriz), e outra curva com adições crescentes de padrão em suco de uva (matriz). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Para o método da florizina, as curvas tanto na água quanto no suco, foram realizadas nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Para o método do sorbitol, as curvas foram realizadas nas concentrações de 10,0; 50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 1000,0; 2000,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Após a análise das curvas, foi aplicado o teste F descrito na fórmula (1) do item 2.6.1, para analisar a variância e verificar se haviam diferença significativa entre elas.

### **3.1.2 Linearidade**

Através dos resultados obtidos no teste F da seletividade, foi possível estabelecer se a curva analítica de cada composto deveria ser realizada na água ou no suco de uva. Após, foi realizada a curva analítica com sete concentrações para cada analito, foram analisadas oito vezes cada concentração. Foi estabelecido como parâmetro de avaliação,  $R^2 > 0,99$  para os dois métodos estudados, conforme o procedimento de validação de métodos do LAREN.

O cálculo dos resíduos de cada curva foi realizado através da diferença entre o valor médio observado e o valor real de cada concentração, pela equação da reta de regressão, para cada concentração da curva analítica. Após a obtenção dos resultados, foi elaborado um gráfico dos resíduos de cada curva, relacionando o resíduo ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) com a concentração do padrão ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

### **3.1.3 Limite de detecção**

O cálculo do LD dos métodos foi realizado através de sete repetições da análise da amostra do branco (água milli-Q), e após, foi aplicada a fórmula (2), descrita no item 2.6.3 (p. 32).

### **3.1.4 Limite de quantificação**

O LQ dos métodos foi calculado através da análise de sete repetições da análise da amostra branco, e posterior aplicação da fórmula (3), descrita no item 2.6.4 (p. 32).

### **3.1.5 Faixa de trabalho**

Após os estudos da seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação dos métodos, foi estabelecida a faixa de trabalho de cada método. Como primeiro ponto de cada

curva, utilizou-se o valor do LQ observado em cada método, e o último ponto foi estipulado conforme a linearidade e a faixa de aplicação de cada método.

### **3.1.6 Precisão**

O cálculo da precisão dos métodos foi realizado através da repetitividade, expresso pelo desvio padrão e o coeficiente de variação. Foram analisadas sete repetições dos sete pontos da curva em cada método, e após, foram calculados os resultados através da fórmula 4, descrita no item 2.6.6 (p. 33). O critério de aceitação foi baseado na AOAC (2012), conforme o Quadro 1 (p. 34).

### **3.1.7 Exatidão**

Devido à falta de comparações interlaboratoriais e materiais de referência certificados com valores conhecidos de florizina e sorbitol, o estudo da exatidão dos métodos foi realizado através de ensaios de recuperação.

Foram realizados ensaios fortificando uma matriz branco com concentrações crescentes dos analitos (curva analítica de cada método), cada concentração foi analisada sete vezes, e foram calculadas as taxas de recuperação das quantidades conhecidas de cada analito através da fórmula 5, descrita no item 2.6.7 (p. 34). O critério de aceitação para a exatidão foi baseado na AOAC (2012), Quadro 2 (p. 35).

### **3.1.8 Estabilidade**

A estabilidade dos padrões de florizina e sorbitol foi determinada através da análise de das soluções padrão preparadas de  $60 \text{ mgL}^{-1}$  e  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente (analisada em dias consecutivos). O critério de aceitação estabelecido avaliação dos resultados, foi uma variação de até 5% na concentração dos padrões.

### 3.1.9 Robustez

Na avaliação da robustez dos métodos, foram testados dois parâmetros: fluxo da fase móvel e temperatura da coluna de análise.

Para avaliar a variação do fluxo da fase móvel da florizina, foram verificados os resultados do padrão de concentração conhecida ( $60,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nos fluxos: 1,45, 1,50 e  $1,55 \text{ ml.min}^{-1}$ . No caso da temperatura da coluna, foram observados os resultados do padrão de concentração conhecida ( $60,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) com a variação de três temperaturas: 24, 25 e  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para avaliar a variação do fluxo da fase móvel do sorbitol, foram verificados os resultados do padrão de concentração conhecida ( $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nos fluxos: 0,55, 0,60 e  $0,65 \text{ ml.min}^{-1}$ . No caso da temperatura da coluna, foram observados os resultados do padrão de concentração conhecida ( $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com variação de três temperaturas: 78, 79 e  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Após a obtenção dos resultados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança, nos resultados de cada parâmetro analisado e os dados foram avaliados da seguinte forma: se  $F$  (correspondente ao  $F$  calculado)  $< F$  crítico, é uma evidência de que os fatores analisados não possuem diferenças significativas entre seus resultados. Caso  $F > F$  crítico, os fatores analisados possuem diferenças significativas entre seus resultados.

## 3.2 AMOSTRAS

### 3.2.1 Amostras utilizadas para a validação e aplicação dos métodos

Foram coletados sucos concentrados de uva das cultivares Isabel, Concord e Bordô e sucos de maçã concentrados das cultivares Fugi e Gala, ao final do processo de elaboração (saída do concentrador), na empresa Tecnovin do Brasil Ltda, na safra 2012.

### **3.2.2 Amostras de sucos comerciais**

Foram analisadas, em triplicatas, 28 amostras de sucos de uva tinto e 4 amostras de sucos de maçã comerciais a fim de avaliar as quantidades de florizina e sorbitol dos mesmos, assim como a correlação entre esses compostos.

## **3.3 MÉTODOS**

Os sucos coletados foram diluídos à 14° Brix para padronização. A fim de avaliar a adição de suco de maçã em suco de uva, foram realizados testes, para cada cultivar de suco de uva, com adição de suco de maçã das cultivares Gala e Fuji, nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25 e 30%.

Todos os sucos (utilizados na validação dos métodos e os sucos comerciais) foram diluídos 2x (a fim de preservar a coluna de análise, devido ao alto conteúdo de açúcares nos sucos que podem danificar a coluna). Em todos os sucos foram realizadas análises de florizina e sorbitol, em triplicatas.

### **3.3.1 Reagentes e padrões**

Os reagentes utilizados para análise da florizina foram: ácido orto-fosfórico 85% e acetonitrila, ambos grau gradiente para cromatografia líquida, da marca Merck®. O padrão de florizina utilizado foi da marca Sigma-Aldrich (CAS 7061-54-3). O padrão de sorbitol utilizado foi um padrão rastreável da European Pharmacopeia Reference Standard (CAS 50-70-4). Todos os certificados dos reagentes e padrões utilizados neste trabalho encontram-se no LAREN.

### 3.3.2 Método para determinação da florizina

Para análise da florizina, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de conjunto de fotodiodos (DAD) da marca Agilent Technologies®. A determinação de florizina foi realizada através da adaptação do método de Schieber et al. (2001). Foi utilizada coluna Zorbax 300SB-C18, de 4,6 x 250mm e 5µm a 25°C e pré-coluna 300SB-C18, ambas da marca Agilent Technologies®. A fase móvel foi: solvente A (ácido acético 1,5 % (v/v)), solvente B (ácido acético 1,5 % e acetonitrila, 60:40 (v/v)). O fluxo utilizado foi 1,50 ml.min<sup>-1</sup>, com comprimento de onda de 320 nm e volume de injeção da amostra de 10 µl. O gradiente de eluição dos solventes foi: 3% do solvente B durante 6 min, 3% a 100% do solvente B do tempo 6 a 30 min, após, manter por manter 5 min a 100% do solvente B.

Todas amostras foram filtradas em membranas de éster de celulose, de 13 mm de diâmetro e 0,8 µm de poro, e as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em mg.L<sup>-1</sup> de florizina.

### 3.3.3 Método para determinação do sorbitol

Para análise do sorbitol, foi utilizado um CLAE com índice de refração (IR), da marca Agilent Technologies®. A determinação do sorbitol foi realizada através da adaptação do método oficial da Comunidade Européia (NF EN 12630, 1999). Foi utilizada coluna Aminex® HPX-87C, de 300 x 7,8 mm da marca BIO-RAD a 80°C, pré-coluna do mesmo modelo e água milli-Q como fase móvel com fluxo isocrático de 0,60 ml.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção das amostras foi de 20 µl.

Todas amostras foram filtradas em membranas de 13 mm de diâmetro e 0,8 µm de poro, e as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em mg.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para analisar a robustez dos métodos, os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Através dos resultados dos testes de adição de suco de maçã em suco de uva, foi realizado um modelo de regressão linear entre os valores de florizina e sorbitol dos sucos de uva em relação à porcentagem de adição de suco de maçã.

Para avaliar a relação entre a concentração de florizina e sorbitol nos sucos de uva comerciais, foi utilizado o Teste Exato de Fischer, que permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, de elas serem independentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos parâmetros da seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez, nos métodos da florizina e do sorbitol, foi possível avaliar o desempenho dos dois métodos.

### 4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A FLORIZINA

#### 4.1.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade, foi aplicado o teste F descrito na fórmula (1) do item 2.6.1, que permitiu analisar as variâncias das duas curvas realizadas com e sem a presença da matriz (ANEXO C). Verificou-se que as curvas não possuem diferenças significativas entre a variabilidade da análise de florizina (Figura 5), pois,  $F_{\text{calculado}}$  (18,8) foi menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  (19,0), portanto, a seletividade do método foi comprovada. Observou-se através deste resultado, a possibilidade de utilizar como curva de calibração, a curva realizada com água.

FIGURA 5 – Curva analítica da florizina com e sem a matriz

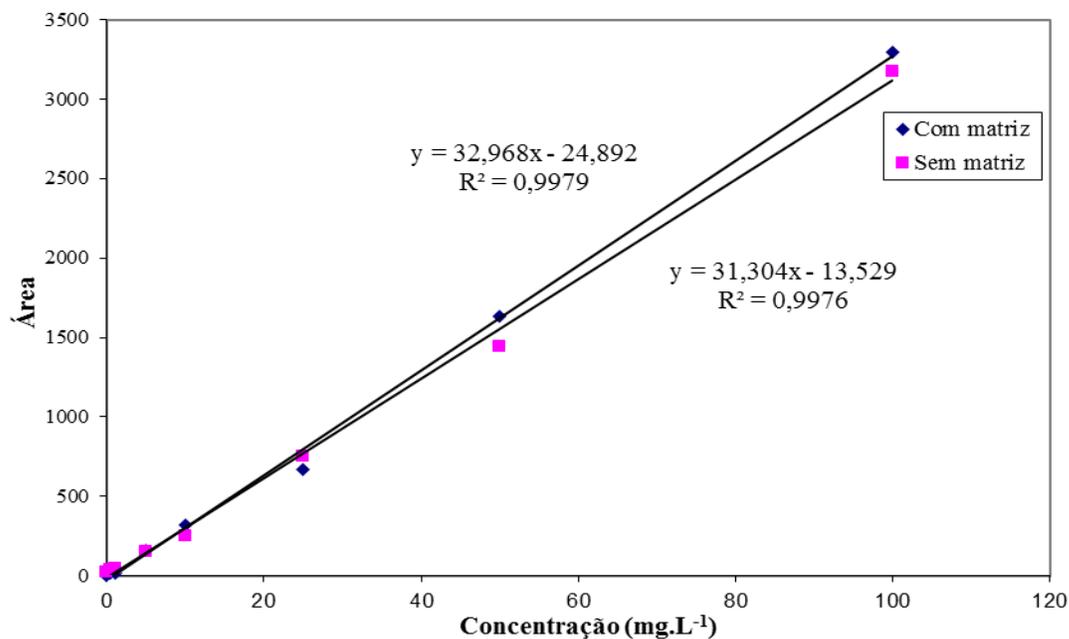
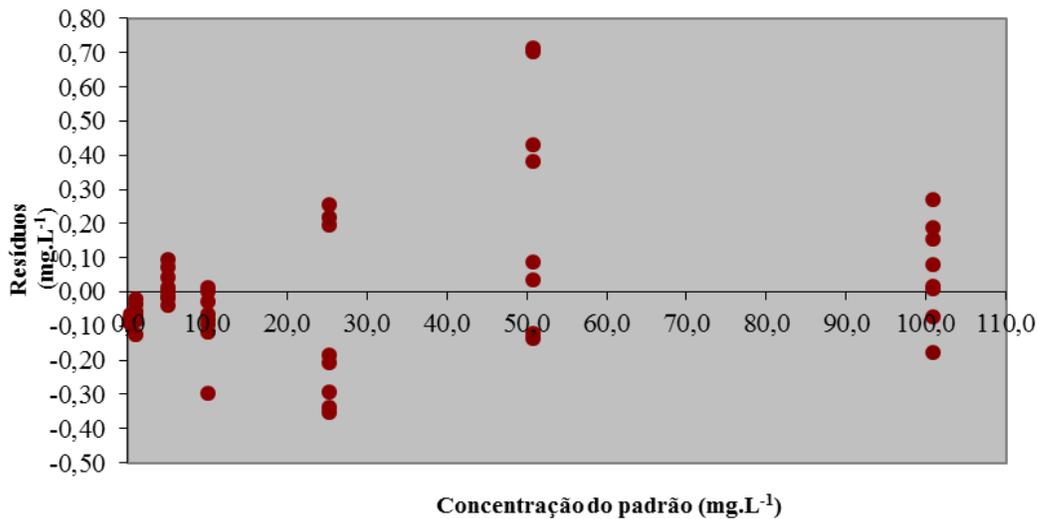




FIGURA 6 – Distribuição dos resíduos da curva de calibração da florizina em água



#### 4.1.3 Limite de detecção

O LD determinado a partir dos resultados das análises de sete alíquotas da amostra branco e aplicação da fórmula (2), descrita no item 2.6.3 (p. 32), foi de 0,08 mg.L<sup>-1</sup>, inferior ao de Versari et al. (1997), que obtiveram um limite de detecção para florizina de 1,20 mg.L<sup>-1</sup> utilizando outro método de análise, também em CLAE.

#### 4.1.4 Limite de quantificação

O LQ do método, calculado através da análise de sete repetições da amostra branco, e posterior aplicação da fórmula (3), descrita no item 2.6.4 (p. 32), foi de 0,09 mg.L<sup>-1</sup>, consequentemente resultado abaixo deste valor não são quantificáveis.

#### 4.1.5 Faixa de trabalho

Através da curva de calibração da florizina, apresentada na Figura 6, item 4.1.2, observou-se que nas concentrações da faixa de trabalho (0,51 a 101 mg.L<sup>-1</sup>), este método mostrou-se linear.

#### 4.1.6 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetitividade de sete concentrações distintas, analisadas com sete repetições, e após, foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração dos padrões de florizina x DPR

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	DPR (%)
0,51	4,85
1,01	2,98
5,05	0,92
10,1	0,96
25,3	1,05
50,5	0,68
101	0,14

Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando repetitividade tanto do método quanto do analista, pois, os resultados apresentam um DPR menor que o estabelecido pela AOAC (2012), que estabelece para as concentrações 0,51 a 1,01 mg.L<sup>-1</sup> um máximo de 11 %, para as concentrações de 5,05 a 10,1, um máximo de 7,3 % e para as concentrações de 25,2 a 101, um máximo de 5,3 %. Estes resultados estão de acordo com os de Versari et al. (1997), que obtiveram uma repetibilidade de 0,80 a 1,10 % em concentrações de 5,00 a 6,00 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.7 Exatidão

Os resultados da recuperação obtidos a partir da fortificação da matriz com florizina em sete diferentes concentrações, analisados cada uma sete vezes, encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3 - Concentração florizina x recuperação média**

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Recuperação média (%)
0,51	101
1,01	98,5
5,05	98,2
10,1	100,0
25,3	100,0
50,5	99,4
101	99,9

Os resultados foram satisfatórios, pois se obteve uma recuperação média entre 98,2 a 100 %. Na faixa de 0,51 a 50,5 mg.L<sup>-1</sup> o critério de aceitação para a exatidão, conforme o Quadro 2, é de 80 a 110 %, e para a concentração de 101 mg.L<sup>-1</sup> é 90 a 107 %. No estudo de Jham (1996), a faixa de recuperação obtida foi de 87 a 92 % nas análises de florizina nas folhas e caule de maçãs.

#### 4.1.8 Estabilidade

Para a análise da estabilidade do padrão de florizina, foi elaborado um padrão de 60,0 mg.L<sup>-1</sup> (conservado em geladeira à aproximadamente 4 °C), o qual foi analisado em dias aleatórios, no período de 0 a 66 dias, conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Estabilidade do padrão de florizina de 60 mg.L<sup>-1</sup>

Dias	Concentração média (mg.L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão	Padrão restante (%)
1	58,50 ± 0,60		97,50
3	59,49 ± 0,81		99,14
4	61,31 ± 0,73		102,18
5	62,11 ± 0,54		103,52
6	61,19 ± 0,41		101,98
7	60,60 ± 0,38		101,00
19	60,99 ± 0,53		101,65
43	63,53 ± 0,46		105,88
65	62,90 ± 0,65		104,83
66	63,00 ± 0,39		105,00

Observou-se que no período de 66 dias, as concentrações do padrão variaram na faixa de 58,5 a 63,5 mg.L<sup>-1</sup>, podendo ser considerado estável neste período. Lanças (2004) sugere como critério de aceitação para uma solução estável, uma variação de até 10% na concentração do analito de interesse em relação à concentração média no tempo zero. Utilizamos o mesmo critério de aceitação, estabelecendo assim uma variação de até 10% na concentração do padrão analisado, portanto, para um padrão de 60,0 mg.L<sup>-1</sup> a variação na sua leitura poderia ser de 54,0 a 66,0 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.9 Robustez

Na avaliação da robustez do método da florizina, foram testados parâmetros que poderiam interferir nos resultados das análises, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna de análise.

Os resultados do padrão de concentração conhecida ( $60,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nos diferentes fluxos da fase móvel estão representados na Tabela 5. Através da aplicação da ANOVA, observou-se que  $F > F_{\text{crítico}}$ , ( $80,9 > 3,55$ ), sendo assim, conclui-se que o fator analisado possui diferenças significativas entre seus resultados. Portanto, o fluxo de análise deve ser mantido a  $1,50 \text{ ml.min}^{-1}$  sem variações.

Tabela 5 – Concentração média de florizina em diferentes fluxos de análise

Fluxo ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração média ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Desvio Padrão
1,45	63,3 ± 0,57	
1,50	61,0 ± 0,38	
1,55	59,9 ± 0,59	

Na Tabela 6, estão representados os resultados obtidos do padrão de concentração conhecida ( $60,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para a variação da temperatura da coluna cromatográfica. Foi observado através da aplicação da ANOVA nos resultados, que  $F > F_{\text{crítico}}$ , ( $46,3 > 3,5$ ), portanto conclui-se que este fator analisado também possui diferenças significativas entre seus resultados. Portanto, a temperatura da coluna de análise deve ser mantida a  $25^\circ\text{C}$ . Na prática não ocorre variação maior que de  $1^\circ\text{C}$  na temperatura da coluna, mas sim, variações menores, como  $0,1^\circ\text{C}$ , porém não pode ser testado, pois o Software utilizado aceita temperaturas exatas.

Tabela 6 – Concentração de florizina em diferentes temperaturas da coluna de análise

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Concentração média ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Desvio Padrão
24,0	63,2 ± 0,77	
25,0	61,4 ± 0,38	
26,0	61,5 ± 0,69	

O método da florizina foi considerado robusto para as condições de análise estabelecidas: fluxo de análise de  $1,50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  e temperatura da coluna a  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.2 ADIÇÕES DE SUCO DE MAÇÃ EM SUCO DE UVA (FLORIZINA)

Dentre os sucos de uva genuínos analisados, o suco da cultivar Bordô foi o que apresentou maior teor de florizina ( $0,45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), seguido pelas cultivares Concord ( $0,41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e Isabel ( $0,35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para os sucos de uva. Para os sucos de maçã, a cultivar Gala apresentou  $11,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , enquanto o suco da cultivar Fugi apresentou  $11,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de florizina. Em sucos de maçã elaborados a partir de 175 cultivares distintas provenientes de doze países, Eisele e Drake (2005) obtiveram a média de florizina de  $26,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e valor máximo  $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Os resultados de florizina nos sucos de uva das cultivares Concord, Isabel e Bordô adicionados dos sucos de maçã Gala e Fugi em concentrações crescentes, estão representados abaixo nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

FIGURA 7 - Concentração de florizina em suco de uva Concord adicionado de suco de maçã Gala e Fugi

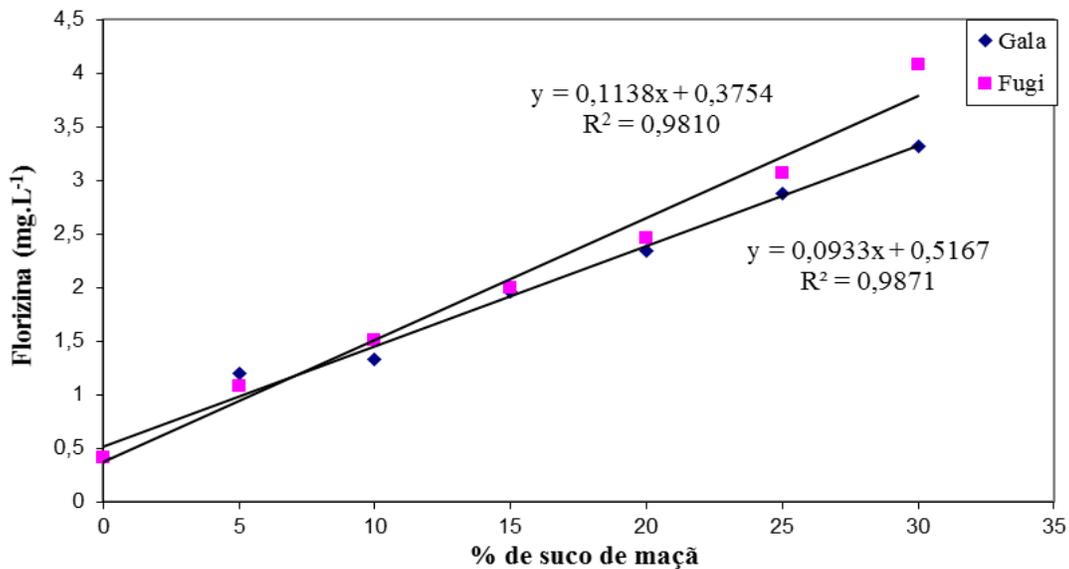


FIGURA 8 - Concentração de florizina em suco de uva Isabel adicionado de suco de maçã Gala e Fuji

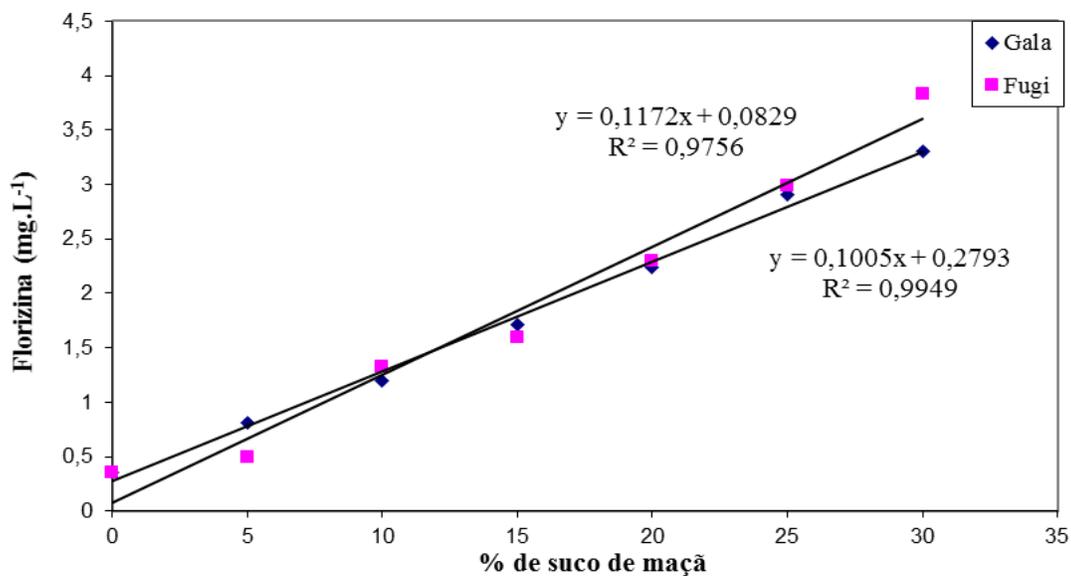
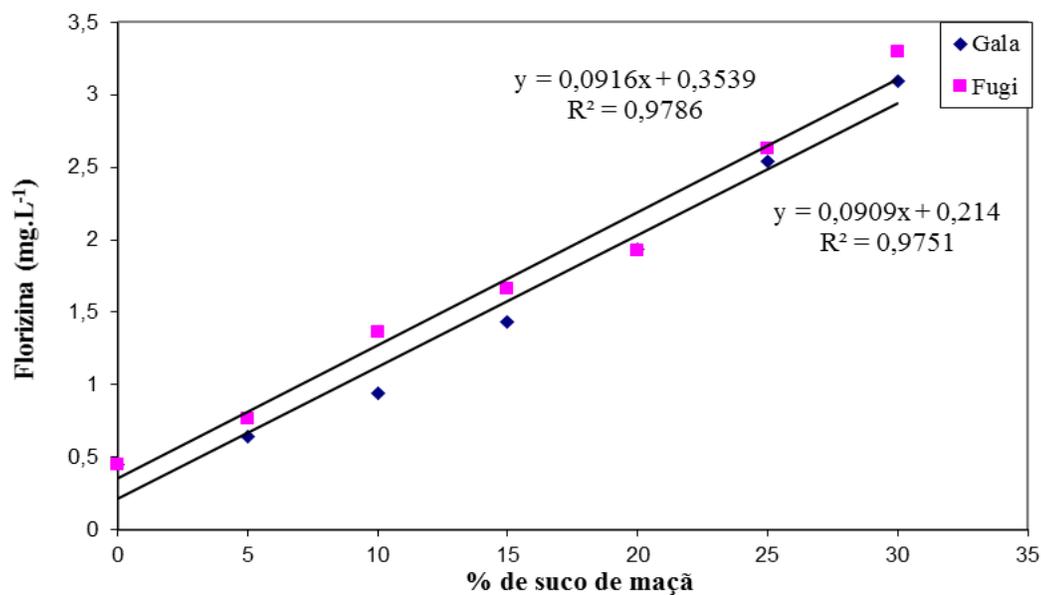
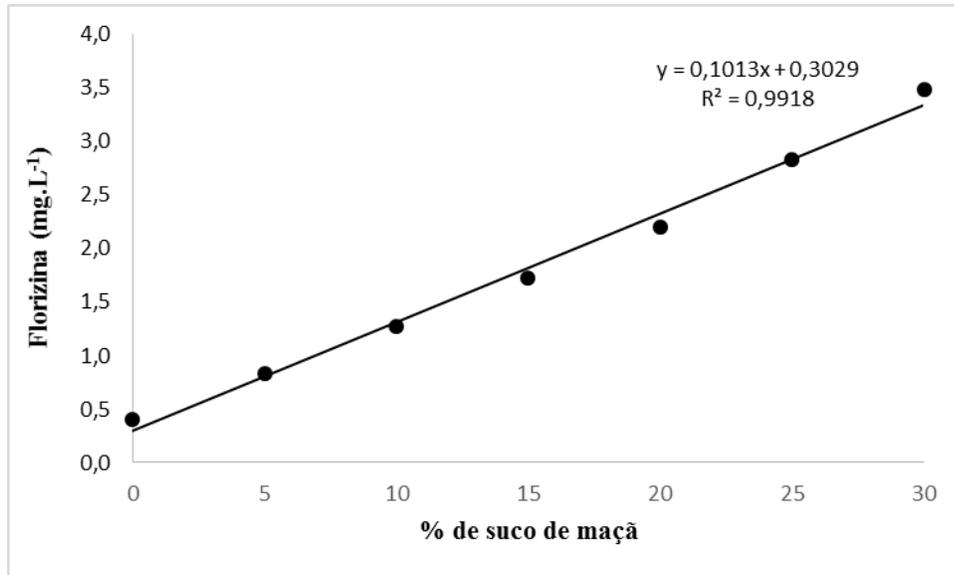


FIGURA 9 - Concentração de florizina em suco de uva Bordô adicionado de suco de maçã Gala e Fuji



Relacionando a quantidade média de florizina de todos os sucos de uva em relação a porcentagem de suco de maçã Gala e Fuji adicionados (Figura 10), foi obtida uma equação linear pela qual foi possível estimar a porcentagem de suco de maçã no suco de uva.

FIGURA 10 – Relação entre a concentração de florizina e porcentagem de suco de maçã



Baseado na equação de reta obtida, para um acréscimo de 5 % de suco de maçã em suco de uva, a concentração de florizina é de 0,80 mg.L<sup>-1</sup>, já para um acréscimo de 10 %, a concentração aumenta para 1,31 mg.L<sup>-1</sup>.

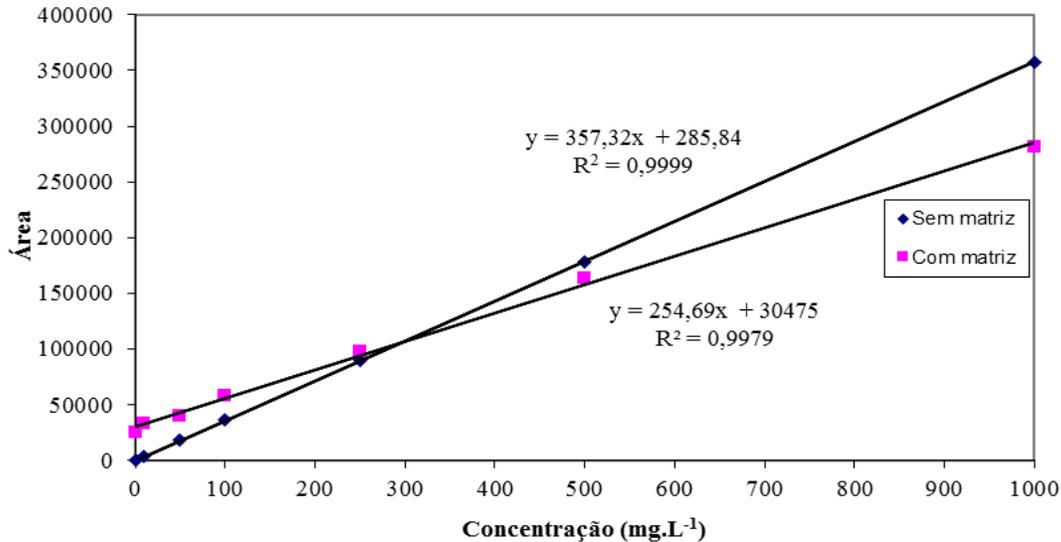
### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA O SORBITOL

#### 4.3.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade, foi aplicado o teste F descrito na fórmula (1) do item 2.6.1, que permitiu analisar as variâncias das duas curvas realizadas com e sem a presença da matriz (ANEXO C). Verificou-se que as curvas não possuem diferenças significativas entre a variabilidade das análises de sorbitol (Figura 11), pois,  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{calculado}} = 0,08$  e

$F_{\text{tabelado}} = 19,0$  (ANEXO A)), portanto, a seletividade do método foi comprovada. Observou-se através deste resultado, a possibilidade de utilizar como curva de calibração, a curva realizada na água.

FIGURA 11 – Curva analítica do sorbitol com e sem a matriz



#### 4.3.2 Linearidade

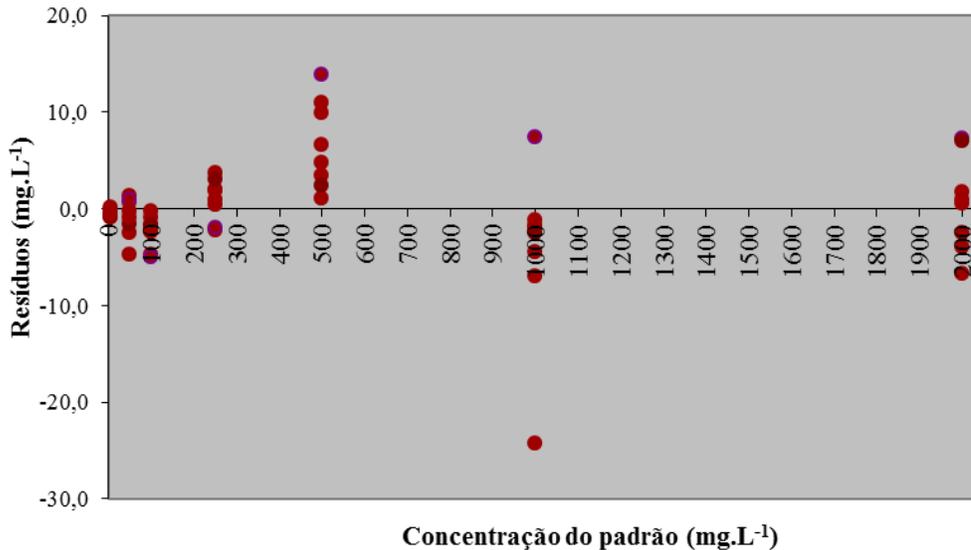
Através dos resultados obtidos no teste F da seletividade, foi observado que a curva analítica deveria ser realizada na água. Portanto, foi realizada a curva analítica com sete concentrações crescentes de padrão de sorbitol e a partir dos resultados, foi elaborado um gráfico dos resíduos da curva (Figura 12).

No intervalo de concentração de 5,00 a 2000 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 7), o método do sorbitol mostrou-se linear. Podemos observar que o  $R^2$  foi satisfatório ( $R^2 = 0,9999$ ) (Figura 12), tendo em vista que o valor obtido foi superior ao critério de aceitação estabelecido nesse estudo, no qual  $R^2$  deve ser maior que 0,99. O método confirmou-se linear com boa reprodução, pois os perfis dos resíduos das regressões lineares se mostraram aleatórios, o que significa a ausência de erros sistemáticos, confirmando uma aceitável reprodução da análise.

Tabela 7 - Curva analítica do sorbitol em água

Ponto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentrações encontradas								Média
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 6	Rep 7	Rep 8	
1	0,00	3,69	3,71	3,71	3,67	3,66	3,67	3,71	3,69	3,69
2	5,00	5,58	5,72	5,04	5,92	5,46	5,70	4,90	5,48	5,48
3	50,0	48,7	49,3	54,7	52,5	49,0	51,6	50,2	50,9	50,9
4	100	101	100	102	105	105	102	102	102	102
5	250	252	248	246	248	252	247	250	249	249
6	500	490	489	497	499	486	498	495	493	493
7	1000	1002	1007	1001	1002	993	1002	1024	1004	1004
8	2000	2002	2007	2004	1999	1993	1993	1998	1999	1999

FIGURA 12 – Distribuição dos resíduos da curva de calibração do sorbitol.



#### 4.3.3 Limite de Detecção

O LD determinado a partir dos resultados de sete alíquotas da amostra branco e aplicação da fórmula (2), descrita no item 2.6.3 (p. 32), foi de 3,76 mg.L<sup>-1</sup>, superior aos valores

relatados por Burda e Collins (1991) que obtiveram um limite de detecção em vinhos de 0,10 mg.L<sup>-1</sup> em cromatógrafo gasoso.

#### **4.3.4 Limite de Quantificação**

O LQ do método do sorbitol, calculado através da análise de sete repetições da amostra branco, e posterior aplicação da fórmula (3), descrita no item 2.6.4 (p. 32), foi de 3,92 mg.L<sup>-1</sup>. Foi estabelecido, portanto, que resultados abaixo de 3,92 mg.L<sup>-1</sup> eram não quantificáveis.

#### **4.3.5 Faixa de Trabalho**

Através da curva de calibração do sorbitol, apresentada na Figura 12, item 4.3.1, observou-se que nas concentrações da faixa de trabalho (5,00 a 2000 mg.L<sup>-1</sup>), este método mostrou-se linear.

#### **4.3.6 Precisão**

A precisão do método foi determinada através da repetitividade de sete concentrações distintas, analisadas com sete repetições, e após, foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração dos padrões de sorbitol x DPR

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	DPR (%)
5,0	6,29
50,0	3,99
100	1,66
250	0,87
500	0,92
1000	0,90
2000	0,25

Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando repetitividade tanto do método quanto do analista, pois, todos os resultados apresentaram um DPR menor que o estabelecido pela AOAC (2012), que estabelece para as concentrações 1,00 a 10,0 mg.L<sup>-1</sup> um máximo de 7,3 %, para as concentrações de 10,0 a 100 mg.L<sup>-1</sup>, um máximo de 5,3 % e para as concentrações de 100 a 1000 mg.L<sup>-1</sup>, um máximo de 3,7 %.

#### 4.3.7 Exatidão

Os resultados da recuperação média, obtidos a partir da fortificação da matriz branca com sorbitol e suas respectivas repetições se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de sorbitol x recuperação média

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Recuperação média (%)
50,0	94,3
100	98,7
250	98,1
500	97,9
1000	100
2000	100

Os resultados foram satisfatórios, pois se obteve uma recuperação média entre 94,3 a 100 %. Na faixa de 50,0 a 100 mg.L<sup>-1</sup>, o critério de aceitação para a exatidão, conforme o Quadro 2, é de 90 a 107 %, para a faixa de 100 a 1000 mg.L<sup>-1</sup> o critério é de 90,0 a 105 % e para a faixa de 1000 a 2000 mg.L<sup>-1</sup>, de 97,0 a 103 %.

#### 4.3.8 Estabilidade

Para a análise da estabilidade do padrão de sorbitol, foi elaborado um padrão de 50,0 mg.L<sup>-1</sup>, (conservado em geladeira à aproximadamente 4 °C), o qual foi analisado em dias aleatórios, no período de 0 a 13 dias, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Estabilidade do padrão de sorbitol de 50 mg.L<sup>-1</sup>

Dias	Concentração média (mg.L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão	Padrão restante (%)
1	51,3	± 1,03	103
2	50,0	± 0,56	100
7	50,1	± 0,09	100
8	50,3	± 0,96	101
9	45,7	± 0,77	91,5
13	40,0	± 1,01	80,0

Pode-se observar a partir do 9º dia ocorre uma degradação do padrão de sorbitol. Como neste trabalho foi estipulado como critério de aceitação uma variação de até 10% na concentração do padrão analisado, para um padrão de 50,0 mg.L<sup>-1</sup>, a variação pode ser de 45,0 a 55,0 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, observou-se que o padrão tem validade média de 8 dias.

#### 4.3.9 Robustez

Na avaliação da robustez do método do sorbitol, foram testados parâmetros que poderiam interferir nos resultados das análises, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna de análise.

Os resultados do padrão de concentração conhecida (50,0 mg.L<sup>-1</sup>) nos diferentes fluxos da fase móvel estão representados na Tabela 11. Através da aplicação da ANOVA, observou-se que  $F > F_{\text{crítico}}$ , (11,3 > 3,55) (ANEXO A), sendo assim, conclui-se que o fator analisado possui diferenças significativas entre seus resultados. Portanto, o fluxo de análise deve ser mantido estável a 0,60 ml.min<sup>-1</sup>.

Tabela 11 – Concentração de sorbitol em diferentes fluxos de análise

Fluxo (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração média (mg.L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão
0,55	50,9 ± 1,15	
0,60	47,8 ± 1,70	
0,65	48,4 ± 0,96	

Na Tabela 12, estão representados os resultados obtidos do padrão de concentração conhecida (50,0 mg.L<sup>-1</sup>) para a variação da temperatura da coluna cromatográfica. Foi observado que através da aplicação da ANOVA, que  $F > F_{\text{crítico}}$ , (2,39 < 3,55), sendo assim conclui-se que o fator analisado não possui diferenças significativas entre seus resultados. Portanto, podem ocorrer pequenas variações (1 °C) na temperatura da coluna de análise (intencionais) sem interferência no resultado. Variações de temperatura não intencionais são normalmente de 0,1 °C.

Tabela 12 – Concentração de sorbitol em diferentes temperaturas da coluna de análise

Temperatura (°C)	Concentração média (mg.L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão
78,0	46,0 ± 0,81	
79,0	47,2 ± 2,00	
80,0	47,8 ± 1,70	

O método do sorbitol foi considerado robusto para as condições de análise estabelecidas: fluxo de análise de 0,60 ml.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna a 80°C.

#### 4.4 ADIÇÕES DE SUCO DE MAÇÃ EM SUCO DE UVA (SORBITOL)

Foram realizadas análises de sorbitol nos sucos de uva e de maçã. O suco da cultivar Isabel foi o que apresentou maior conteúdo de sorbitol ( $119 \text{ mg.L}^{-1}$ ), seguido pelas cultivares Bordô ( $88,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Concord ( $78,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O suco de maçã da cultivar Gala apresentou  $3006 \text{ mg.L}^{-1}$  de sorbitol e o suco da cultivar Fugi apresentou  $4804 \text{ mg.L}^{-1}$ . No estudo realizado por Eisele e Drake (2005) que analisaram sorbitol em sucos de maçã, eles obtiveram uma média de  $4500 \text{ mg.L}^{-1}$  e valor máximo de  $14000 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Os resultados das adições dos sucos de maçã das cultivares Gala e Fugi nos sucos de uva das cultivares Concord, Isabel e Bordô, estão representados abaixo nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

Devido ao suco da cultivar Fugi apresentar conteúdo de sorbitol superior ao suco da cultivar Gala, os testes de adição de suco de maçã Fugi nos sucos de uva, apresentaram conteúdo de sorbitol superior aos realizados com adição de suco de maçã Gala (aproximadamente o dobro).

FIGURA 13 - Concentração de sorbitol em suco de uva Concord adicionado de suco de maçã Gala e Fugi

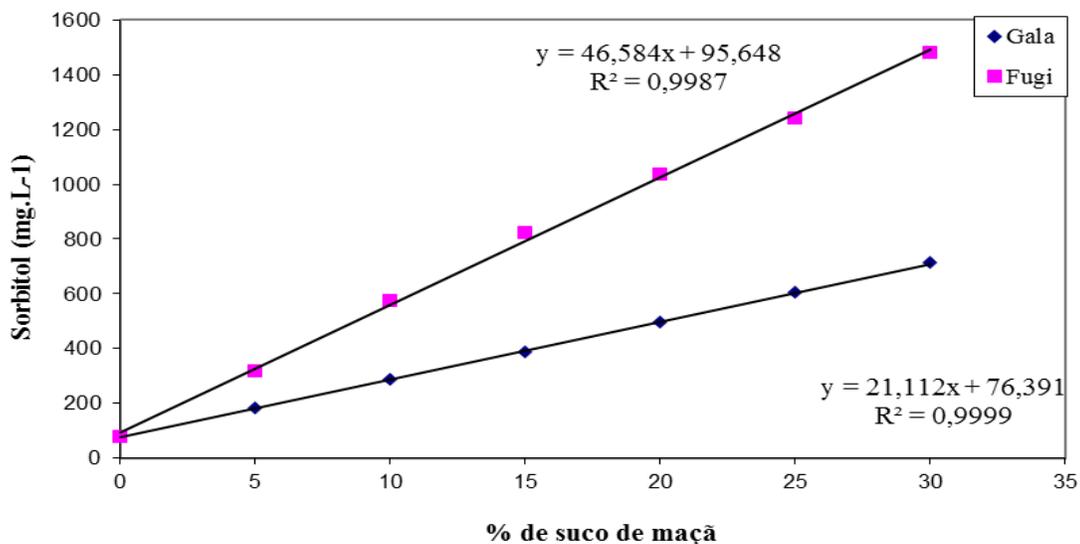


FIGURA 14 - Concentração de sorbitol em suco de uva Isabel adicionado de suco de maçã Gala e Fuji

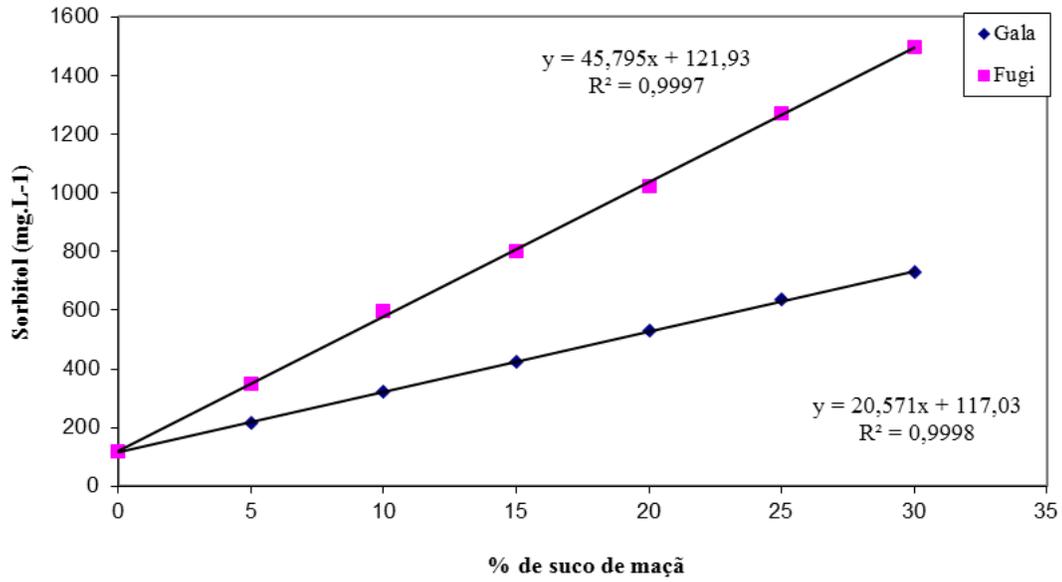
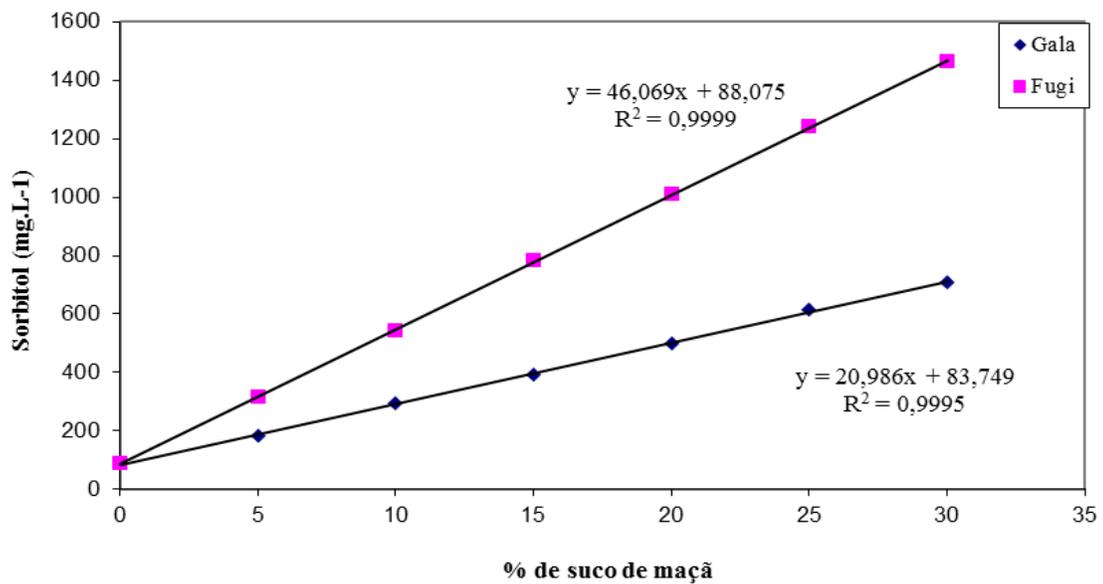


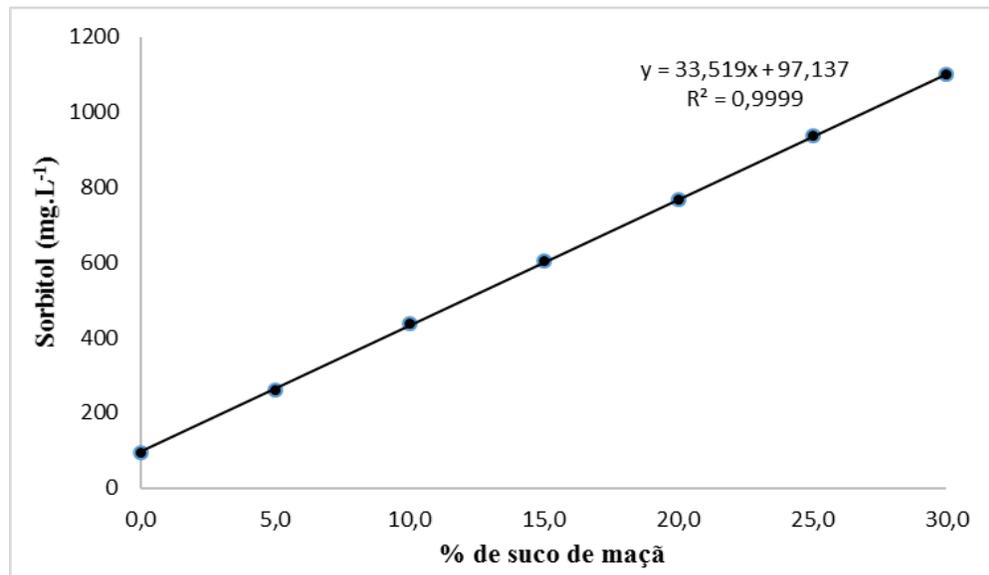
FIGURA 15 - Concentração de sorbitol em suco de uva Bordô adicionado de suco de maçã Gala e Fuji



Dennis, Massey e Bigwood (1994) analisaram o conteúdo de sorbitol em vinhos comerciais e a maior parte dos vinhos apresentaram teores menores que  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , porém, nos vinhos, o sorbitol é formado durante a fermentação alcoólica. Nos sucos, como não ocorre a fermentação alcoólica, estes valores são inferiores.

Relacionando a quantidade média de sorbitol dos sucos de uva das três cultivares analisadas em relação à porcentagem de suco de maçã Gala e Fuji adicionados (Figura 16), foi obtida uma equação linear pela qual foi possível estimar a porcentagem de suco de maçã no suco de uva.

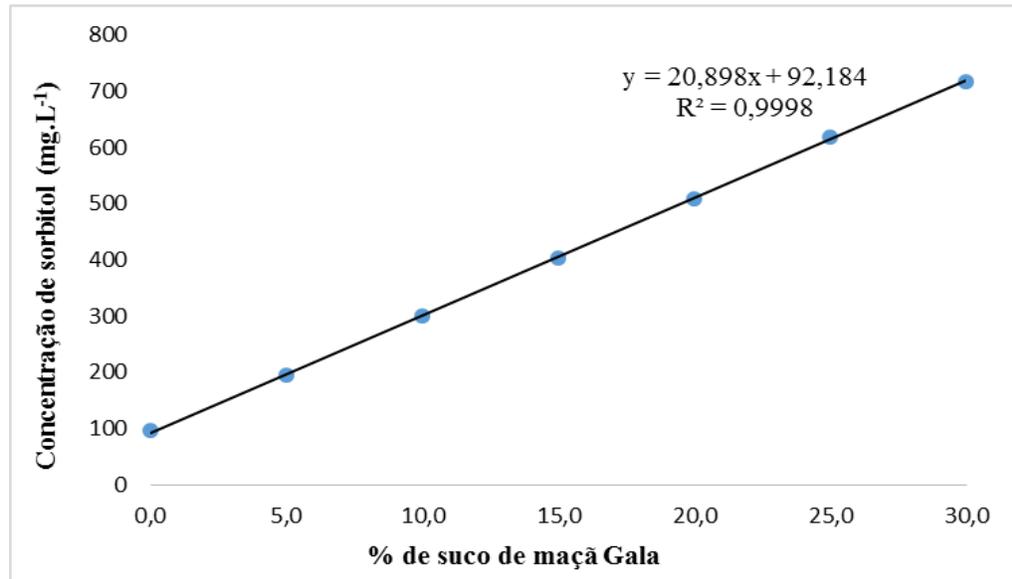
FIGURA 16 - Relação entre a quantidade de sorbitol e a porcentagem de suco de maçã (Gala e Fuji)



Conforme a equação obtida, para um acréscimo de 5 % de suco de maçã em suco de uva, estima-se que a concentração de sorbitol seja em torno de  $265 \text{ mg.L}^{-1}$ , já para um acréscimo de 10 %, esta concentração aumenta para  $432 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Considerando que a produção da cultivar Gala no RS é predominante e apresentou quantidade de sorbitol inferior a cultivar Fuji, foi realizada uma equação linear pela qual foi possível estimar a porcentagem de suco de maçã Gala nos sucos de uva (Figura 17). Observando a equação obtida, as concentrações de sorbitol em relação à equação anterior são menores, ou seja, para um acréscimo de 5 % de suco de maçã Gala em suco de uva a concentração de sorbitol é de  $197 \text{ mg.L}^{-1}$ , já para um acréscimo de 10 %, a concentração é de  $302 \text{ mg.L}^{-1}$ .

FIGURA 17 - Relação entre a quantidade de sorbitol e porcentagem de suco de maçã Gala



#### 4.5 ANÁLISE DE FLORIZINA E SORBITOL EM SUCOS COMERCIAIS

Os resultados das análises de florizina e sorbitol em sucos de uva comerciais de diferentes marcas estão apresentados na Tabela 13. De todos os sucos analisados, quatro ficaram abaixo do limite de quantificação para a análise de florizina ( $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ ), porém nenhum resultado ficou abaixo do limite de quantificação na análise de sorbitol ( $3,92 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Os valores médios de florizina, nos sucos de uva comerciais analisados, variaram de  $0,15 \pm 0,04$  a  $8,39 \pm 0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ , e de sorbitol, de  $56,1 \pm 2,74$  a  $1526 \pm 61,4 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir das médias dos resultados de florizina e sorbitol nos sucos de uva comerciais, foi estimada a porcentagem de suco de maçã nos mesmos através das equações lineares das Figuras 10, 16 e 17, respectivamente. Os três sucos que apresentaram as maiores concentrações de florizina (sucos 1, 2 e 3), também apresentaram maior concentração de sorbitol, indicando que houve adição de suco de maçã nestes sucos de uva.

O suco número quatro apresentou presença de suco de maçã acima de 10 % em relação a concentração da florizina (18,4 %). Em relação ao sorbitol, não foi detectada a adição do suco de maçã. Os sucos cinco e seis apresentaram porcentagem de suco de maçã maior que 5 % se

considerarmos a florizina, porém também não apresentaram sorbitol. Os outros vinte e um sucos analisados, não apresentaram indicações de adição de suco de maçã, tanto na análise de florizina quanto para a análise de sorbitol.

Em relação ao sorbitol (Tabela 13), a porcentagem de adição de suco de maçã aumentou quando calculada somente com a cultivar Gala, pois esta cultivar apresentou menor concentração de sorbitol. Esta estimativa é mais perto da nossa realidade em função da maior produção de maçãs Gala e conseqüente maior quantidade de frutos de descarte desta variedade. Devido a variação da concentração de florizina e sorbitol nos sucos das diferentes variedades de maçã, torna-se difícil estabelecer um limite percentual. Por esta razão, e por não ser permitido a adição de suco de maçã em suco de uva, sugerimos que o resultado da análise, para detecção de fraude, seja expresso em presença ou ausência de suco de maçã.

TABELA 13 - Resultados de florizina e sorbitol em sucos de uva comerciais e respectiva percentagem de possível adição de suco de maçã

Suco	Florizina (mg.L <sup>-1</sup> )		Sorbitol (mg.L <sup>-1</sup> )		Florizina	Sorbitol	Sorbitol
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	% de suco de maçã Gala e Fuji	% de suco de maçã Gala e Fuji	% de suco de maçã Gala
1	8,39	± 0,18	1527	± 61,5	79,9	42,6	68,6
2	7,13	± 0,15	1275	± 16,1	67,4	35,2	56,6
3	4,54	± 0,09	1112	± 27,4	41,9	30,3	48,8
4	2,17	± 0,10	110	± 5,50	18,4	0,39	0,87
5	0,95	± 0,01	84,1	± 0,18	6,39	0,00	0,00
6	0,82	± 0,03	72,8	± 0,53	5,14	0,00	0,00
7	0,77	± 0,04	104	± 2,01	4,58	0,20	0,56
8	0,72	± 0,05	72,2	± 9,80	4,15	0,00	0,00
9	0,71	± 0,02	121	± 4,96	4,05	0,70	1,36
10	0,63	± 0,03	90,1	± 6,29	3,26	0,00	0,00
11	0,55	± 0,04	58,5	± 3,23	2,41	0,00	0,00
12	0,43	± 0,02	98,7	± 0,10	1,29	0,05	0,31
13	0,38	± 0,03	77,8	± 3,36	0,76	0,00	0,00
14	0,36	± 0,02	141	± 0,92	0,53	1,32	2,35
15	0,35	± 0,05	109	± 1,17	0,50	0,35	0,80
16	0,34	± 0,01	130	± 0,80	0,33	0,97	1,80
17	0,31	± 0,05	156	± 4,51	0,10	1,75	3,04
18	0,31	± 0,06	180	± 6,31	0,04	2,47	4,19
19	0,31	± 0,05	58,2	± 4,04	0,07	0,00	0,00
20	0,25	± 0,02	88,2	± 0,27	0,00	0,00	0,00
21	0,23	± 0,01	81,6	± 2,82	0,00	0,00	0,00
22	0,22	± 0,02	80,3	± 4,45	0,00	0,00	0,00
23	0,22	± 0,01	89,0	± 0,97	0,00	0,00	0,00
24	0,15	± 0,04	56,1	± 2,74	0,00	0,00	0,00
25	NQ		67,9	± 0,61	0,00	0,00	0,00
26	NQ		56,4	± 1,13	0,00	0,00	0,00
27	NQ		88,3	± 1,59	0,00	0,00	0,00
28	NQ		99,9	± 0,59	0,00	0,08	0,37

NQ = Valor inferior ao limite de quantificação do método.

Na Tabela 14, foram considerados dois parâmetros para avaliação dos resultados dos sucos comerciais analisados, 5 % e 10 % de adição de suco de maçã.

Através da aplicação do Teste Exato de Fisher para os dois casos, observou-se que ambos foram significativos (para 5% o  $p=0,006$  e para 10% o  $p=0,001$ ), ou seja, em ambos a presença de florizina está associada a presença de sorbitol, assim como a ausência de florizina está associada a ausência de sorbitol. Sendo assim, as análises se mostraram eficientes e se complementam entre si. A partir disto, observa-se que o ideal seria a realização das duas análises simultaneamente nas amostras de suco de uva.

Tabela 14 - Número de amostras adulteradas considerando limite de 5 e 10 % de presença de suco de maçã

Florizina	5%		10%	
	Sorbitol		Sorbitol	
	+	-	+	-
+	3	3	3	1
-	0	22	0	24

Do total de sucos de uva comerciais analisados (28 amostras), considerando a presença de 5% de suco de maçã, três amostras (sucos 1, 2 e 3) foram consideradas positivas tanto para os resultados de florizina como para o sorbitol e outras três amostras (sucos 4, 5 e 6) foram positivas somente para florizina. Nenhum suco foi negativo para sorbitol e positivo para florizina e 22 sucos não indicaram a presença de suco de maçã em suco de uva tanto para os resultados de florizina como para os resultados de sorbitol.

Considerando-se uma adição de 10% de suco de maçã, novamente três amostras foram consideradas positivas com os resultados de florizina como para os de sorbitol, porém somente 1 amostra foi positiva para a análise de florizina (suco 4). Nenhum suco foi negativo para sorbitol e positivo para florizina e 24 sucos não indicaram a presença de suco de maçã em suco de uva com os resultados de florizina como também para os resultados de sorbitol.

Os resultados de florizina e sorbitol em sucos de maçã comerciais foram superiores aos dos sucos de maçã coletados da indústria, conforme apresenta a Tabela 15. Porém, inferiores aos

resultados relatados em outros trabalhos. A média de florizina dos sucos de maçã comerciais foi  $11,82 \pm 0,10 \text{ mg.L}^{-1}$  e a média de sorbitol,  $7951,3 \pm 172,18$ .

Tabela 15 - Resultados de florizina e sorbitol em sucos de maçã comerciais

Suco	Florizina ( $\text{mg.L}^{-1}$ )		Sorbitol ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	4,95	$\pm 0,01$	3400,0	$\pm 197,99$
2	17,39	$\pm 0,09$	10448,0	$\pm 175,36$
3	15,43	$\pm 0,10$	9268,0	$\pm 189,50$
4	9,52	$\pm 0,21$	8689,0	$\pm 125,87$
Média	11,82	$\pm 0,10$	7951,3	$\pm 172,18$

Schieber, Keller e Carle (2001) encontraram valores em torno de  $24,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de florizina em sucos de maçã. Gokmen et al. (2001) analisaram sucos de maçã experimentais e encontraram uma média de  $27,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de florizina e observaram que a composição fenólica do suco de maçã é significativamente afetada por diferentes tratamentos de clarificação. Em cinco dos seis tratamentos de clarificação testados, o conteúdo médio de florizina diminuiu significativamente após tratamentos de clarificação. A adição de enzimas no suco de maçã também causa um decréscimo de aproximadamente 31 % na concentração de florizina (VAN DER SLUIS et al. 2002). Em sucos de maçã comerciais, Versari et al. (1997) encontraram valores médios que variaram entre  $12,0$  a  $38,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Em relação ao sorbitol, Fuleki, Pelayo e Palabay (1994) analisaram sucos de maçã experimentais de 11 cultivares e a média de sorbitol encontrado variou entre 900 a  $6100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Lee e Wrolstad (1988) analisaram sucos de maçã comerciais e experimentais e observaram uma média de  $3600,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de sorbitol. Esses autores relataram que diversos fatores influenciam no conteúdo de sorbitol dos sucos de maçã, como a cultivar e safra.

Portanto, a análise de sucos de outras safras é necessário para acompanhar a variação que de florizina e sorbitol que ocorre devido as variações climáticas entre safras.

## 5 CONCLUSÕES

Foram obtidos resultados satisfatórios para os parâmetros da seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez, para ambos os métodos da florizina e do sorbitol.

As concentrações de florizina e sorbitol nos sucos de uva são baixas, ao contrário dos sucos de maçã que possuem maiores concentrações destes compostos.

Através dos testes de adição de suco de maçã em suco de uva foi possível estimar a presença de suco de maçã em suco de uva.

Os sucos de uva que apresentaram concentração elevada de sorbitol também possuem concentração elevada de florizina.

Para uma afirmação mais precisa de adulteração de suco de uva através do acréscimo de suco de maçã, é recomendada a análise dos dois compostos, florizina e sorbitol simultaneamente nos sucos de uva.

Os métodos da florizina e do sorbitol foram eficazes para detectar a adição de suco de maçã em suco de uva e serão enviados ao MAPA como métodos oficiais de análise para detecção de suco de maçã em suco de uva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOMI. (2012). Disponível em: <[http://www.agapomi.com.br/arquivos/Safra\\_11\\_2012.pdf](http://www.agapomi.com.br/arquivos/Safra_11_2012.pdf)>  
Acesso em: 11 de dez. de 2012.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALBANO, F. M.; RODRIGUEZ, M. T. R. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Guia Prático. Porto Alegre, Rede Metrológica RS, 2009. 136 p.
- AMIOT, M. J. et al. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 4, p. 958-962, 1992.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **NBR ISO/IEC 17025:2005 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Guidelines for standard method performance requirements**, Official Methods of Analysis of AOAC International, v. 2, 2012.
- AWAD, M. A.; DE JAGUER, A.; WESTING, L. M. V. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in apple fruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, p. 249-263, 2000.
- BALBI, S. F. **Estudo do impacto de stress abiótico controlado na componente bioactiva de polpas de maçã**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa, 2009, 82 f.
- BONAGA, G; PALLOTTA, U.; SYRGHI, K. Influenza delle sostanze polifenoliche sulla qualità dei vini bianchi. Parte prima. **Vini d'Italia**, v. 4, p. 13-30, 1990.

BRACKMANN et al. Qualidade de maçãs cv. 'Gala' armazenadas em diferentes pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 195 -198, 2000.

BRASIL (1990). **Decreto nº 99.066, de 8 de março de 1990**. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, n. 1, p. 126-146, 2003.

BURDA, K.; COLLINS, M. Adulteration of wine with sorbitol and apple juice. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 5, p. 381-382, 1991.

BURDA, S.; OLESZEK, W.; LEE, G. Y. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 945-948, 1990.

CABRITA, M. J.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. 2003. **Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos**. Trabalho apresentado em I Seminário Internacional de Vitivinicultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **BRS CORA Nova cultivar de uva para suco, adaptada a climas tropicais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 7p. (Comunicado Técnico 53). Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot053.pdf>. Acesso em: 08 de abr. 2013.

DANI, C.; OLIBONI, L.S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically or conventionally produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2574-2580, 2007.

DELAGE et al. High performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider Apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 555, n. 1-2, 1991.

DE MELLO, L.M.R. **Produção e mercado brasileiro de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. (Comunicado técnico, 50).

DE MELLO, L.M.R. **Viticultura brasileira: panorama 2011**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. (Comunicado técnico, 115).

DENNIS, M. J.; MASSEY, R. C.; BIGWOOD, T. Investigation of the sorbitol content of wines and an assessment of its authenticity using stable isotope ratio mass spectrometry. **Analyst**, v. 119, p. 2057-2060, 1994.

DE SIMON, F. B. et al. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1531–1535, 1992.

DICK, A. J. et al. Flavonoid glycosides of Spartan apple peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 529–531, 1987.

DONG, H. et al. Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus Polystachyus* rehd. **Molecules**, v. 12, p. 552-562, 2007.

EISELE, T. A.; DRAKE, S. R. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 213–221, 2005.

EMBRAPA (2005). **Sistema de Produção de Uvas Rústicas para Processamento em Regiões Tropicais do Brasil**. Disponível em:  
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm>>. Acesso em: 20 de dez de 2012.

FIGUEIRA, R. et al. **Análise isotópica ( $^{13}\text{C}$ ) e legalidade em néctares de uva**. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 28, n. 2, p. 233-246, 2010.

FIORAVANÇO, J. C. et al. **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2010. 60 p.

FITELSON, J. Detection of adulteration in fruit juices by qualitative determination of carbohydrates by gas-liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 53, p. 1193–1197, 1970.

FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 2ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 783p.

FROMM, M. et al. Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1232-42, 2012.

FULEKI, T.; PELAYO, E. Sugars, alcohols, and hdroxymethylfurfural in authentic varietal and commercial grape juices. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 1, p. 59-66, 1993.

FULEKI, T.; PELAYO, E.; PALABAY, R. B. Sugar composition of varietal juices produced from fresh and stored apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1266-1275, 1994.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 3ª ed. Porto Alegre: Renascença, 2008, 368 p.

GOKMEN, V. et al. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p. 194-199, 2001.

GOSCH, C.; HALBWIRTH, H.; STICH, K. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. **Phytochemistry**, v. 71, p. 838-843, 2010.

GROCHOWSKA, M. J. Chromatographic degradation of phloridzin. **Plant Physiology**, v. 41, n. 3, p. 432-43, 1966.

HERNANDEZ, T. et al. Variations in the phenolic composition of fruit juices with different treatments. **Lebensm Unters Forsch**, v. 204, p. 151-155, 1997.

IBRAVIN (2013). **A vitivinicultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 22 de jan. 2013.

IFOAM (2005). International Federation of Organic Agriculture Movements. Disponível em: <<http://www.ifoam.org>>. Acesso em: 10 de set. 2013.

INMETRO (2011). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010. Documento de caráter orientativo.

JHAM, G. N. High-performance liquid chromatographic quantitation of phloridzin in apple seed, leaf and callus. **Journal of Chromatography**, v. 719, p. 444-449, 1996.

JANZANTTI, N.; FRANCO, M. R. B.; WOSIAKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

JONAS, R.; SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 321-36, 2004.

KERMASHA, S. et al. Analyses of phenolic and furfural compounds in concentrated and non-concentrated apple juices. **Food Research International**, v. 28, n. 3, p. 245-252, 1995.

KOEPPEN, B. H. Why we must get to know fruit sugars. **Food Industries in South Africa**, v. 26, n. 12, p. 23-25, 1974.

LANCASTER, J. E. Regulation of skin color in apples. **Critical Reviews Plant Sciences**, v. 10, p. 487-502, 1992.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMA, 2004, 62p.

LEA, A. G. H. Reversed-phase high performance liquid chromatography of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidising apple juices using a pH shift technique. **Journal of Chromatography**, v. 238, p. 253-257, 1982.

LEE, H. S.; WROLSTAD, R. E. Apple juice composition: sugar, nonvolatile acid and phenolic profiles. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n.4, p. 789-794, 1988.

LI, M.; FENG, F.; CHENG, L. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1-14, 2012

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95 - 111, 2004.

**NF EN 12630**. Fruit and vegetables juices - Determination of glucose, fructose, sorbitol and sucrose contents. European Committee for Standardization (1999).

NICOLAS, J. J. et al. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109–157, 1994.

NOGUEIRA, A. et al. Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v.12, n. 3, p. 15-23, 2006.

OLESZEK, W. et al. Identification of some phenolic compounds in apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 430–432, 1988.

PAGANINI, C. et al. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PILANDO, L. S., WROLSTAD, R. E. Compositional profiles of fruit juice concentrates and sweeteners. **Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 19–27, 1992.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-781, 2004.

RIBERÉAU-GAYON, P. et al. **Tratado de Enologia. Tomo 2. Química del Vino: Estabilización y Tratamientos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003. 655p.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J.B. **Elaboração do suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998, 24p.

RIZZON, L. A; MENEGUZZO, J. **Suco de Uva - Coleção Agroindústria Familiar**. Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2007, 45 p.

SANTANA, M. T. A. S. et al. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, 2008.

SAURE, M. C. External control of antocyanin formation in apple. **Scientia Horticulturae**, v. 42, p. 181-218, 1990.

SCAPIN, M. A. et al. **Validação do método e avaliação da incerteza na determinação de maiores e menores constituintes em solos e sedimentos por WDXRF**. International Nuclear Atlantic Conference - INAC, Santos, SP (2005).

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 910, p. 265-273, 2001.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995. 331 p.

SILVA, B. M et al. Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: Uma revisão. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 2, n. 4, p. 184-191, 1999.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. **Como iniciar a validação de métodos analíticos**. Trabalho apresentado no ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo (REMESP), São Paulo, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS. 2001.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. Gene expression is highly regulated in early developing fruit of apple. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n. 4, p. 885-897, 2011.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing, and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1565–1571, 1990.

SPONHOLZ, W. R., LACHER, M., DITTRICH, H. H., Die bildung von alditolen durch die hefen des weines. **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel**, v. 10, p. 19-24, 1986.

THAVARAJAH, P.; LOW, N. H. Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.13, p. 4861 - 4867, 2006.

TREUTTER, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 181-218, 2001.

TŘÍSKA, J.; HOUŠKA, M. Physical methods of resveratrol induction in grapes and grape products – A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, n. 6, p. 489–502, 2012.

UVIBRA (2013). **Comercialização de vinhos e derivados elaborados no RS de 2008 à 2013**. Disponível em: [http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2008a2013\\_mar.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2008a2013_mar.pdf). Acesso em 15 de abr. 2013.

VAN BUREN, J.; DE VOS, L.; PILNIK, W. Polyphenols in golden delicious apple juices in relation to method of preparation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 448 - 451, 1976.

VAN DER SLUIS, A. A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3606–3013, 2001.

VAN DER SLUIS, A. A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. Effect of existing production methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7211-7219, 2002.

VAN GORSEL, H. et al. Compositional characterization of prune juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 784 - 789, 1992.

VEDEANU, N. S. et al. Antioxidant potential and authenticity of some commercial fruit juices studied by EPR and IRMS. **Chemical Papers**, v. 66, n. 6, p. 612 - 616, 2012.

VERSARI, A. et al. Adulteration of fruit juices: dihydrochalcones as quality markers for apple juice identification. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 585 - 589, 1997.

VIGGIANO, C. E. O produto dietético no Brasil e sua importância para indivíduos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 36 - 42, 2003.

WILSON, E. L. High-pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, p. 257 - 264, 1981.

WROLSTAD, R. E.; SHALLENBERGER, R. S. Free sugar and sorbitol in fruits - a compilation from the literature. **Journal Association of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 91 - 103, 1981.

ANEXO A - Tabela de distribuição F

n - graus de liberdade do denominador		m - graus de liberdade do numerador																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞	
1	.100	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86	60.19	60.71	61.22	61.74	62.00	62.26	62.53	62.79	63.06	63.33	
	.050	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	243.90	245.95	248.02	249.05	250.10	251.14	252.20	253.25	254.32	
	.025	647.79	799.48	864.15	899.60	921.83	937.11	948.20	956.64	963.28	968.63	976.72	984.87	993.08	997.27	1001.40	1005.60	1009.79	1014.04	1018.26	
	.010	4052.18	4999.34	5403.53	5624.26	5763.96	5858.95	5928.33	5980.95	6022.40	6055.93	6108.68	6156.97	6208.66	6234.27	6260.35	6286.43	6312.97	6339.51	6365.59	
	2	.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.41	9.42	9.44	9.45	9.46	9.47	9.47	9.48	9.49
		.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
		.025	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45	39.46	39.46	39.47	39.48	39.49	39.50
		.010	98.50	99.00	99.16	99.25	99.30	99.33	99.36	99.38	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45	99.46	99.47	99.48	99.48	99.49	99.50
	3	.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.20	5.18	5.18	5.17	5.16	5.15	5.14	5.13
		.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
		.025	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17	14.12	14.08	14.04	13.99	13.95	13.90
		.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.34	27.23	27.05	26.87	26.69	26.60	26.50	26.41	26.32	26.22	26.13
4	.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.90	3.87	3.84	3.83	3.82	3.80	3.79	3.78	3.76	
	.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	
	.025	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90	8.84	8.75	8.66	8.56	8.51	8.46	8.41	8.36	8.31	8.26	
	.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02	13.93	13.84	13.75	13.65	13.56	13.46	
5	.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.24	3.21	3.19	3.17	3.16	3.14	3.12	3.11	
	.050	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.69	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37	
	.025	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68	6.62	6.52	6.43	6.33	6.28	6.23	6.18	6.12	6.07	6.02	
	.010	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55	9.47	9.38	9.29	9.20	9.11	9.02	
6	.100	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.90	2.87	2.84	2.82	2.80	2.78	2.76	2.74	2.72	
	.050	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	
	.025	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52	5.46	5.37	5.27	5.17	5.12	5.07	5.01	4.96	4.90	4.85	
	.010	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40	7.31	7.23	7.14	7.06	6.97	6.88	
7	.100	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.67	2.63	2.59	2.58	2.56	2.54	2.51	2.49	2.47	
	.050	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	
	.025	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82	4.76	4.67	4.57	4.47	4.41	4.36	4.31	4.25	4.20	4.14	
	.010	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16	6.07	5.99	5.91	5.82	5.74	5.65	
8	.100	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.38	2.36	2.34	2.32	2.29	
	.050	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	
	.025	7.57	6.06	5.42	5.05	4.82	4.65	4.53	4.43	4.36	4.30	4.20	4.10	4.00	3.95	3.89	3.84	3.78	3.73	3.67	
	.010	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36	5.28	5.20	5.12	5.03	4.95	4.86	
9	.100	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.38	2.34	2.30	2.28	2.25	2.23	2.21	2.18	2.16	
	.050	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	
	.025	7.21	5.71	5.08	4.72	4.48	4.32	4.20	4.10	4.03	3.96	3.87	3.77	3.67	3.61	3.56	3.51	3.45	3.39	3.33	
	.010	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81	4.73	4.65	4.57	4.48	4.40	4.31	

**ANEXO B** – Resultados da seletividade do método da florizina

Curva analítica da florizina sem a presença da matriz

Ponto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Área			Média	Variância
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
2	0,5	17,7	14,2	14,9	15,6	3,5
3	1,0	21,7	15,5	14,3	17,2	15,8
4	5,0	188,5	151,4	149,9	163,3	478,1
5	10,0	361,0	300,0	299,0	320,0	1261,0
6	25,0	804,3	615,0	585,0	668,1	14137,8
7	50,0	1816,0	1543,0	1540,0	1633,0	25119,0
8	100,0	3620,0	3128,0	3143,0	3297,0	78303,0

Curva analítica da florizina com a presença da matriz

Ponto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Área			Média	Variância
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
1	0,0	12,4	33,0	27,0	24,1	112,7
2	0,5	40,0	38,0	33,0	37,0	13,0
3	1,0	42,0	43,0	47,0	44,0	7,0
4	5,0	152,0	148,0	157,0	152,3	20,3
5	10,0	284,0	230,0	241,0	251,7	814,3
6	25,0	723,0	783,0	756,0	754,0	903,0
7	50,0	1426,0	1455,0	1457,0	1446,0	301,0
8	100,0	3251,0	3130,0	3151,0	3177,3	4180,3

## ANEXO C – Resultados da seletividade do método do sorbitol

## Curva analítica do sorbitol sem a presença da matriz

Ponto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Área	Área	Área	Área	Variância
1	0	2,07	1,47	2,22	1,92	0,2
2	10	4122	3288	3355	3588,33	214722,3
3	50	18609	18080	17993	18227,33	111144,3
4	100	36784	35512	36827	36374,33	558176,3
5	250	89495	90746	89791	90010,67	427440,3
6	500	177950	179780	178260	178663,33	959233,3
7	1000	359300	357140	356450	357630,00	2210700,0
8	2000	719230	711550	714000	714926,67	15389633,3

## Curva analítica do sorbitol com a presença da matriz

Ponto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Área	Área	Área	Média	Variância
1	0	26178	25819	25189	25728,67	250650,3
2	10	34949	32822	32210	33327,00	2066799,0
3	50	38903	39337	40789	39676,33	975609,3
4	100	56934	58404	57936	57758,00	563988,0
5	250	97903	98160	98860	98307,67	245316,3
6	500	165230	164798	161709	163912,33	3687664,3
7	1000	272356	286651	284206	281071,00	58457925,0
8	2000	561899	586340	583083	577107,33	176122064,3