



PATROCÍNIOS

Sociedade Portuguesa de Química
Fundação Calouste Gulbenkian
Fundação para a Ciência e Tecnologia
Departamento de Química e Bioquímica da FCUL
Departamento de Química da FCT/UNL
Associação de Turismo de Lisboa
Dias de Sousa, Lda.
Soquímica
Unicam
ILC, Lda.
Emílio de Azevedo Campos., Lda.
Vaz Pereira
Merck Pharma e Química S.A.
Waters - Hucoa Erloss, Lda
Konixbert Hi-Tech, S.A.
Zetatech
Banco MELLO
Cafés Delta
Bebáguas

Actas do 1º Encontro Nacional de Cromatografia

Fundamentos

Desenvolvimento

Aplicações



SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA



FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN

Ficha Técnica

Título
LIVRO DE ACTAS DO 1º ENCONTRO NACIONAL DE CROMATOGRAFIA

Editores
Sociedade Portuguesa de Química
DQB / Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Impressão
Trialgráfica - Artes Gráficas, Lda.

Tiragem
180 exemplares.

Depósito Legal
DL 145351/99

Esta publicação reúne as comunicações apresentadas no 1º Encontro Nacional de Cromatografia, sob a forma de Lições Convocadas, Comunicações Orais e em Painel.
A aceitação das comunicações foi feita com base nos resumos apresentados; o texto integral que aqui se apresenta é da responsabilidade dos respectivos autores.

A Comissão Organizadora

Comissão Organizadora Local

José Manuel F. Nogueira (FCUL)

Ana Costa Freitas (FCT/UNL)

Marco Gomes da Silva (FCT/UNL)

[http:// www.fe.up.pt/~croma](http://www.fe.up.pt/~croma)

Design, Desenvolvimento e Manutenção

Paulo Herbert (FEUP)

Comissão Científica

Ana Costa Freitas - FCT/UNL (Lisboa)

Arminda Alves – FEUP (Porto)

H. Chaves das Neves – FCT/UNL (Lisboa)

Ivonne Delgadillo – UA (Aveiro)

João Pessoa – IST (Lisboa)

José Manuel F. Nogueira – FCUL (Lisboa)

Luís Vilas Boas – IST (Lisboa)

Marco Gomes da Silva - FCT/UNL (Lisboa)

Maria H. Florêncio – FCUL (Lisboa)

Maria Irene Silveira – FFUC (Coimbra)

Odete Maia – UM (Braga)

Victor Freitas – FCUP (Porto)

ÍNDICE

Lições Convidadas.....	1
Fast Capillary GC – How Far Can We Go ?	3
Chiral Selective Capillary Electrophoresis	7
Análise de Fármacos em Meios Biológicos por HPLC	9
Enantioselective Capillary-GC and/ or GC-IRMS in Food Analysis	11
Análise de Micropoluentes Orgânicos em Águas.....	13
Electroforese Capilar na Análise de Compostos Fenólicos	15
Análise de Aminoácidos: Tudo feito ou tudo por fazer?	17
LC-MS no Limiar do Novo Milénio.....	18
Comunicações Orais	21
Inverse Gas Chromatography : A powerful technique	23
Detecção Electroquímica de Compostos Fenólicos em HPLC: Conversão em voltamogramas hidrodinâmicos cílicos e simulação de voltametria integrada.....	25
A Utilização de Factores de Correlação na Análise Quantitativa de Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos por Cromatografia Gás-Líquido.....	27
Trace Analysis of Pesticide Residues in Ground and Drinking Waters by High Performance Thin-Layer Chromatography with Automated Multiple Development	29
Comparação dos Métodos “SPME” e “SDE” na Análise de Compostos Responsáveis pelo Aroma do Vinho	30
Éteres Bifenílicos Quirais: Resolução enantiomérica em fases derivadas de polissacarídeos (HPLC)	32
Thioacidoacidolysis-HPLC Characterisation of Oligo-meric and Polymeric Procyanidin Fractions from Grape Seeds	34
Factores Interferentes na Quantificação dos Alcalóides Maioritários do Tabaco.....	36
Hormonas Esteróides Radioiodadas com Interesse Biomédico: Síntese química e purificação por HPLC	38
Detecção de Tributilo Estanho em Estuários Portugueses por CGC-FID.....	40
Validação de um Método Cromatográfico para Análise do Pentobarbital Sódico em Supositórios	42
Aplicação de GC-MS e HPLC ao Estudo de Extractos de Madeira de <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i>	44
Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace White Wine Aroma Compounds.....	45
Sais Solúveis e Deterioração de Azulejos Antigos	46
A Cromatografia no Estudo de Aromas em Enologia	47
<u>Comunicações em Painéis</u>	49
<u>CROMATOGRAFIA GASOSA.....</u>	49
P1. Micro-Geração de Metano para Determinação do Tempo Morto em Cromatografia Gasosa Capilar	51
P2. Determinação dos Teores de Etanal, Acetato de Etilo, Metanol, 2-Butanol, 1-Propanol, 2-Metil-1-Propanol, 2-Propeno-1-ol, 1-Butanol, 2-Metil-1-Butanol+3-Metil-1-Butanol em Aguardentes Vínicas por CG	53
P3. Estudo da Fracção Livre do Aroma de Vinhos Brancos Elementares das Castas Loureiro, Alvarinho e Albariño	55
P4. Estudo de um Método de Doseamento de Constituintes Voláteis em Vinages de Vinho*	57
P5. A Fermentação Malo-Láctica nos Vinhos <i>versus</i> Composição Química	59
P6. Determinação de Enantiómeros de Aminoácidos em Alimentos na Forma de Ésteres N(O,S)-toxicarbonil heptafluorobutílicos	61
P7. Micro-extracção em Fase Sólida para Análise de Compostos Voláteis Característicos de Produtos de Panificação	63
P8. Pirazinas em Sementes de Cacau Torradas	65

P9. Determinação de THM's em Águas de Abastecimento por SPME-CGC-ECD	67
P10. Monitorização de Trihalometanos em Águas de Consumo Humano por Cromatografia em Fase Gasosa com Injecção de "Head-Space" Estático.....	68
P11. Isolamento e Análise de Marcadores Químicos de Poluição.....	69
P12. Caracterização Físico-Química de Águas Doces Subterrâneas e Superficiais	71
P13. Implementação e Validação de um Método Cromatográfico para a Quantificação de um Herbicida.....	73
P14. Análise por CG-EM de Compostos Voláteis de Madeiras Utilizadas no Envelhecimento de Aguardentes	75
P15. Análise de Compostos Voláteis de Pêssegos e Damascos por Microextracção em Fase Sólida.....	77
P16. Thaumetopoea pityocampa (Den. & Schiff) Pest Management: A chromatographic overview	80
P17. Comparative Study of the Aromas of Ten Pinus Species Using Olfactroscopy and High Resolution Chromatography	82
P18. Flavour a Cacau: Identificação de Compostos Odoríferos Principais	84
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA/ELECTROFORESE CAPILAR	87
P19. Online HPLC Chiroptical Detection of 2-Hydroxyglutaric Acid Enantiomers and Diagnostic of 2-Hydroxyglutaric Acidurias	89
P20. Online HPLC Chiroptical Detection of Active Pharmaceutical Enantiomers and Enantiomeric Purity Determination without Chiral Separation.....	91
P21. Síntese e Separação de Estereoisómeros de Kielcorinas	93
P22. Development and Full ICH Validation of a Direct HPLC Method for the Quality Control of a Pharmaceutical Dosage form Containing Phenol and Salicylic Acid.....	95
P23. HPLC Development and Validation of a Direct Method for Simultaneous Determination of a Pyrethroid Insecticide and One of its Synergists in a Pharmaceutical Dosage Form	96
P24. Avaliação Intralaboratorial de um Método de Quantificação dos ácidos Gállico, Vanílico, Siríngico, Ferúlico e Elágico por HPLC em Aguardentes Envelhecidas.....	97
P25. Análise de Licores Tradicionais do Algarve: HPLC e electroforese capilar	99
P26. Análise de Vinhos Moscatel por HPLC com Detecção Espectrofotométrica e Electroquímica.....	101
P27. Novo Método de Análise de Carbamato de Etilo em Vinhos por HPLC com Detecção Fluorimétrica	103
P28. Azeitonas de Mesa da cv 'Galega': Estudo Cromatográfico de Salmouras de Fermentação	104
P29. Monitorização de Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares por HPLC, em Águas de Consumo Humano, num Concelho da Grande Lisboa, por um Período de 4 Anos (1996/99)	106
P30. Análise de Extractos Polares de Madeira de <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> : Optimização dos métodos de extracção e das condições de análise por HPLC	107
P31. Análise de Águas de Cozedura de Cortiça por HPLC: Detecção Espectrofotometricamente e Electroquímica	108
P32. HPLC Assay of Amino Acids and Oligopeptides. No Derivatization, No Multiple Calibration Curves.....	110
P33. Determinação de Lamotrigina em Soro Humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	112
P34. Doseamento de Ambroxol em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	113
P35. Doseamento de Cisapride em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	114
P36. Identificação e Análise Quantitativa de Catiões Trocáveis em Resíduos Sólidos: Aplicação da técnica de cromatografia líquida.....	115
P37. A Cromatografia Iônica na Análise de Aerosóis	117
P38. Study of Zn-ACE Inhibitor Complexes by LC-MS...	119

P39. Identification of Flavonols and Anthocyanins in the Blackcurrant Juice by Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC-APCI-MS).....	120
P40. Quantificação dos Teores de Açúcares em Queijo por HPLC/IR.....	122
INTRODUÇÃO.....	122
CONCLUSÕES.....	123
SEMINÁRIOS.....	125
Avaliação da Cromatografia Iônica para Especificação de Catiões de Metais Pesados em Águas	127
<u>APOIOS</u>	129

Lições Convidadas

Fast Capillary GC – How Far Can We Go ?

Pat Sandra

Laboratory of Organic Chemistry, University of Gent, Krijgslaan 281 S4, B-9000 Gent, Belgium

Since the introduction of gas chromatography in 1952, there has been an ongoing interest in improving analysis speed. Increasing analysis speed in capillary GC in first instance is dictated by the problem at hand, the primary objective being the complete separation of the compounds in a mixture. In a large number of cases, the plate number of a capillary column is too high for a given separation problem and the resolution may be impaired. Typical ways to shorten the analysis time in this case are: decreasing the column length or increasing the carrier gas flow rate far above the optimum. Recent alternatives include the use of multichannel columns or multicapillaries and flash GC.

Increasing analysis speed for complex profiles without impairing resolution can only be realised by reduction of the internal diameter and the length of the capillary column. A 10 m x 0.1 mm i.d. column offers the same resolution as a 25 m x 0.25 mm i.d. column. Because the column is 2.5 times shorter, the analysis time is reduced drastically. Moreover, since the optimum carrier gas velocity is higher and the Hu curves are flatter for narrow bore columns, higher average carrier gas velocities can be used without loss of resolution.

The different alternatives for high speed or fast capillary GC, have been discussed in depth in the recent literature, but in my opinion, most interesting to report is that recent developments in conventional GC instrumentation meet the requirements to apply capillary columns with internal diameters in the order of 100 µm for routine operation.

This is illustrated with the analysis of a diesel sample with baseline separation of the biomarkers pristane and phytane from the preceding normal hydrocarbons on a standard Hewlett-Packard 6890 (Figure 1). An oven insert (pillow), which is commercially available now, was placed in the oven, reducing its size by 50%. The insert is placed on the front side (door side), so the back inlet and detector are used. The diesel sample was diluted 10 times in cyclohexane and 1 µL was injected in the split mode (1/100 split ratio). The column was a 10 m x 0.1 mm i.d. x 0.1 µm HP-1. The oven was programmed from 100°C to 325°C at 75°C/min and hold for 1 min (4 min program). FID detection with a signal data acquisition rate of 100 Hz was used.

Another obstacle for the use of narrow bore columns is method development and validation. Using narrow bore columns, different operational conditions (inlet pressure, split ratio, temperature program) have to be used. Since little information is yet available on the use of fast capillary GC, the transfer of standard validated operating procedures developed for conventional capillary columns into operating procedures for narrow bore columns might be difficult and definitely hamper their use in a routine environment. In this respect, the development of method translation software by Leon Blumberg and Matthew Klee at Hewlett-Packard, Little Falls, USA, is very helpful for translating a standard operating procedure for a conventional column (whatever its dimensions and stationary phase film thickness) to an operating procedure for a narrow bore column (coated with the same stationary phase).

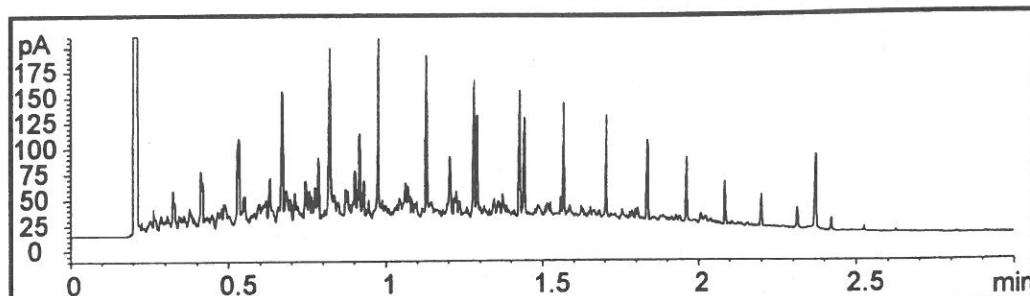


Figure 1. Separation of diesel in 2.5 min on standard GC instrumentation

After performing the analyses on the standard column, the optimized conditions are introduced in the method translation program and all operational conditions for the new column are calculated in order to obtain the same resolution. The gain in analysis time is also predicted. The method translation software is available free of charge from the Hewlett-Packard website. The principle is illustrated with the analysis of an essential oil. Quality control of essential oil samples is routinely done on a 50 to 60 m x 0.25 mm i.d. column using a slow (2 °C/min) temperature program, which results in analysis times in the order of 2 to 3 hours. The same peak capacity can be obtained on shorter narrow bore capillary columns, but, although analysis times can be reduced drastically, quality control labs hesitate to use this approach because changing the column dimensions implies different operational conditions which results in different selectivities. Details of well-known fingerprints can be lost. The application of the method translation software allows the translation from conventional to narrow bore columns with hardly any change in resolution, selectivity and thus fingerprint. This is illustrated with the analysis of nutmeg and oil.

The analysis was first performed on a "standard" column used for detailed essential oil profiling (60 m x 0.25 mm i.d. x 1 µm HP-1, $\beta = 63$, theoretical plate number = 240,000). The operational conditions optimised for routine QC were applied. Secondly, the analyses were repeated on a 20 m x 0.1 mm i.d. x 0.4 µm HP-1, $\beta = 63$ (theoretical plate number = 200000). The operational conditions for the narrow bore column were calculated by using the method translation software. The most important operational conditions are summarized in Table 1. From the method translation software program, a speed gain factor of 5.9 is predicted. Note that the carrier gas in the analyses are helium and hydrogen for the 250 µm i.d. and the 100 µm i.d. columns, respectively.

The chromatograms obtained on the respective columns are compared in Figure 2 top (Nutmeg oil, standard column) and 2 bottom (Nutmeg oil, narrow bore column). From these chromatograms, it is obvious that the resolution is exactly the same on both columns. The analysis on the narrow bore column is much faster. From the last eluting peak, a speed gain factor of 5.7 is measured, which is close to the predicted speed gain of 5.9. Since for the calculation, the nominal column lengths were used, it might be expected that the correlation can even be better if actual column lengths are measured and used in the method translation software.

Table 1 : Experimental conditions for essential oil analysis on a conventional and on a narrow bore column.

Column	60 m x 0.25 mm i.d. x 1 µm HP-1	20 m x 0.1 mm i.d. x 0.4 µm HP-1
Injection	split, 1 µL, 1/50 split ratio, 250°C	split, 1 µL, 1/500 split ratio, 250°C
Carrier Type	helium	hydrogen
Carrier Pressure	209 kPa, constant pressure	<i>411 kPa, constant pressure</i>
Carrier Flow	1.74 mL/min at 50°C	<i>0.87 mL/min at 50°C</i>
Velocity	29.5 cm/s (average at 50°C)	<i>58 cm/s (average at 50°C)</i>
Hold-up time	3.39 min	<i>0.57 min</i>
Oven Program	50°C - 2°C/min - 275°C - 40 min.	<i>50°C - 11.88°C/min - 275°C - 7 min.</i>
Detection	FID	FID
Signal Data Rate	10 Hz	50 Hz
Analysis Time	152.5 min	25.94 min

The conditions in italic for the narrow bore column have been calculated by the method translation software. The standard operating conditions (SOP) on the conventional column apply broader conditions than needed for the two essential oils analysed in this contribution.

New developments in GC instrumentation, including electronic pneumatic control of the column head pressure and of the split flow, fast and reproducible oven heating and faster electronics, offer new possibilities for the implementation of narrow bore columns (100 µm i.d.) in routine quality control. Using the method translation software, an existing operating procedure for a standard capillary column can be translated into an operating procedure for a narrow bore column, resulting in a faster analysis with the same resolution. Both qualitative and quantitative data remain unaffected.

The other approaches for fast GC are always accompanied with loss in resolution. For simple mixtures e.g. in process control, they can be applied.

Chiral Selective Capillary Electrophoresis

Zoltan Juvancz¹, L. Jicsinszky², R. Ivanyi²

¹VITUKI Plc., Institute for Water Quality Control, H-1095, Budapest Kvassay ut. 1, Hungary,
waterquality@vituki.hu (ZJ)

²Cyclolab R&D. Ltd., H-1117, Dombovari ut 5-7., Budapest, Hungary

Members of enantiomer pairs, in spite of their very similar structures, can show rather different biological activity [1]. The possible different actions of drug and agrochemical enantiomers forced authorities to introduce the requirement of enantiomer pure products and their chiral selective analysis.

GC, HPLC and SFC chromatographic methods have been successfully applied for a large number of chiral separations, however, capillary electrophoresis (CE) is the most dynamically developing branch of the chiral analysis [2]. Basically the CE is not a chromatographic method, but its chiral analysis applications include chromatographic processes too. Two enantiomers have to show a different partition toward the chiral selectors and mobility difference between the free and the associated states for their separations. Macrocyclic antibiotics, crown ethers, proteins, linear saccharides, chiral surfactants have been used as chiral selectors, but the cyclodextrins and their derivatives are the most frequently used chiral selectors in CE.

Separations can be improved with oppositely charged separation agents and analytes because their electrophoretic migration have opposite increments [3]. Another great advantage of charged chiral selectors: they can separate not only charged enantiomers but also neutral ones. Neutral chiral selectors can only separate charged enantiomers. On the other hand, a high concentration of charged selectors produces high electric current resulting in low efficiency.

Applications of several neutral (native, alkyl, hydroxyalkyl), negatively (carboxyl, phosphate), and positively (amine) charged cyclodextrins as chiral selectors are demonstrated [4-6]. The resolution of enantiomers depends on the types and concentration of cyclodextrin selectors. A minute different in the substitution pattern of cyclodextrins can cause drastic selectivity shift. The cyclodextrin are multimodal selectors, thus one selector can have a broad chiral recognition range. The chiral selectivity spectrum of derivatized cyclodextrins can broaden further using randomly derivatized products instead of uniform molecules. The composition of background buffers, mostly its pH value has also great influence of separations. A good chiral separation also requests the optimization of other parameters (e.g. ionic strength, viscosity, and organic additives).

Separation of several drugs and agrochemicals prove the usefulness of the CE in chiral analysis. The CE is not only good for the chiral separation of main compounds, but for the separation of the main compound from their by-products and impurities.

Guidelines for development of a chiral selective CE are presented. These advises include systematic approaches as well some practical tricks, including the compensation of wall effect.

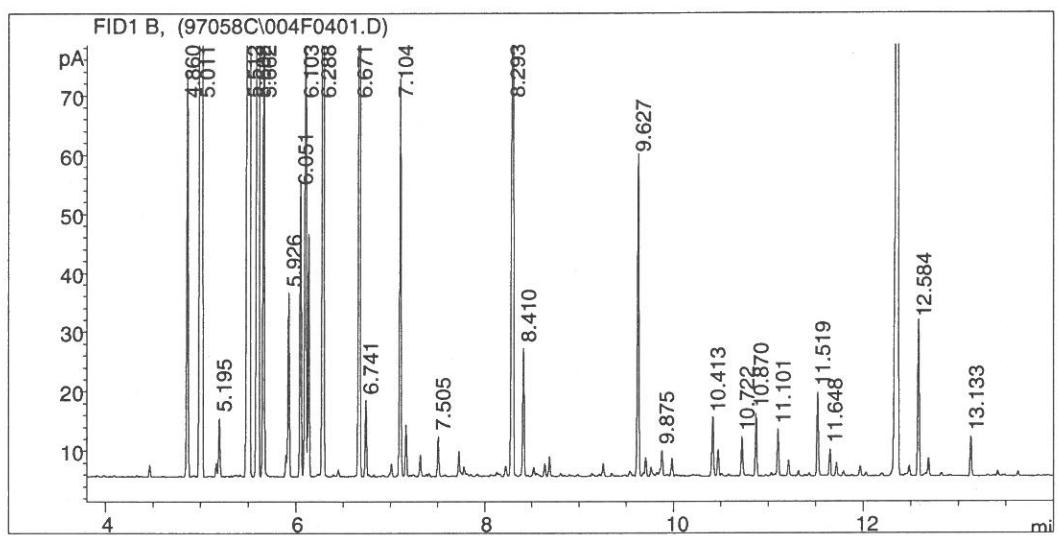
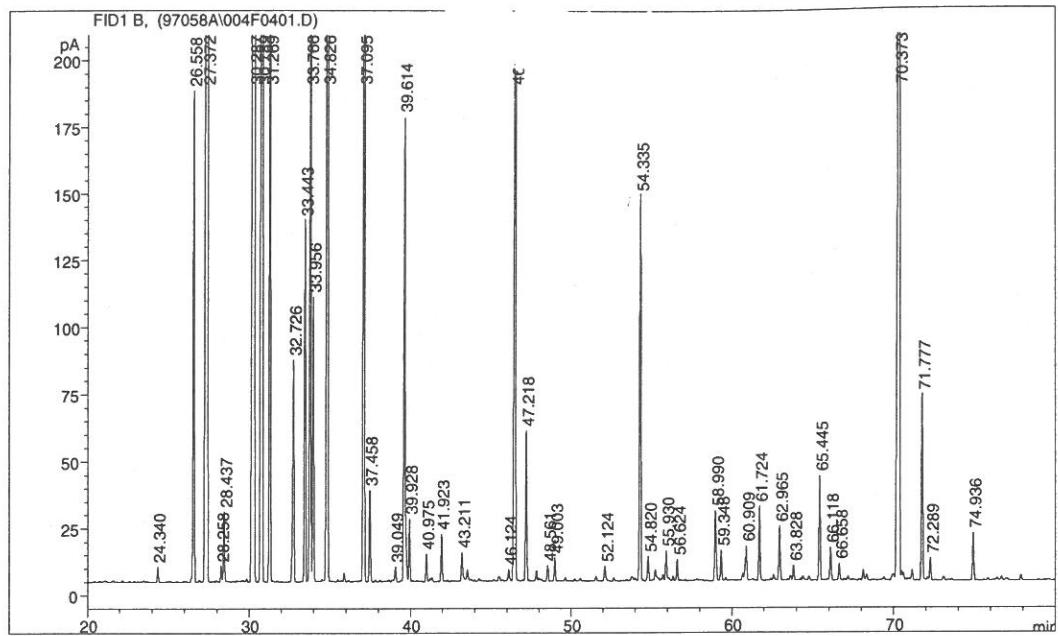


Figure 2. Analyses of Nutmeg oil on a 60 m x 0.25 mm i.d. x 1 μ m HP-1 column (top), and on a 20 m x 0.1 mm i.d. x 0.4 μ m HP-1 column (bottom).

References

- [1] S. Batra, M. A. Seth, P. Bhaduri, in Chirality and future drug design, Progress Drug Research, E. Jucker, Eds., 41, p. 191 (1994).
- [2] B. Chankvetadze, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons, (1997).
- [3] S.A.C. Wren , J. Rowe, J. Chromatogr., 603, 235 (1992).
- [4] Z. Juvancz, L. Jicsinszky, K.E. Markides, J. Microcol.Sep., 9, 581 (1997).
- [5] Z. Juvancz, K.E. Markides, L. Jicsinszky, Electrophoresis 18, 1002, (1997).
- [6] R. Ivanyi, L. Jicsinszky, Z. Juvancz, Chromatographia (submitted).

Análise de Fármacos em Meios Biológicos por HPLC

José A. Guimarães Morais

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

Objectivos da determinação quantitativa de fármacos em meios biológicos

Nas últimas duas a três décadas, o reconhecimento da farmacocinética como ramo das Ciências Farmacológicas capaz de fornecer um corpo de conhecimentos teóricos e experimentais para a descrição, interpretação mecanística e previsão dos processos de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) de xenobióticos, proporcionou a motivação para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias de análise de fármacos em meios biológicos. Por outro lado, a determinação das concentrações de fármacos no plasma/soro sanguíneo ou outro meio biológico, fornece os dados sem os quais não seria possível a caracterização cinética de novos fármacos, a monitorização terapêutica de níveis sanguíneos para fármacos de utilização crítica e as determinações da biodisponibilidade para o estabelecimento da bioequivalência entre medicamentos contendo a mesma substância activa. O desenvolvimento simultâneo e interactivo da metodologia analítica e da farmacocinética caracterizam assim o desenvolvimento de uma larga área das Ciências Farmacológicas nesta última metade do nosso século. Embora outras metodologias analíticas tenham sido ou sejam ainda utilizadas, foi sem dúvida a HPLC a que mais decisivamente contribuiu para este avanço.

Dificuldades no desenvolvimento do método

As características do analito e da matriz (fármaco e meio biológico) determinam a particular dificuldade encontrada pelos analistas no desenvolvimento de métodos. Uma das razões do êxito da HPLC nesta aplicação em particular, resulta do facto de os fármacos serem em geral substâncias polares e/ou ionizáveis e portanto difficilmente analisáveis por cromatografia em fase gasosa que precedeu de algumas décadas a HPLC.

A complexidade da matriz analítica resulta da presença de substâncias endógenas de natureza peptídica ou proteica, glucídica e lipídica e ainda de metabolitos diversos, cofatores, etc., de natureza química extremamente diversa e propriedades fisico-químicas muitas vezes comparáveis às dos fármacos, o que faz com que a possibilidade da interferência seja muito elevada. O uso de extensos processos de preparação da amostra a fim de minimizar interferências e contaminação das colunas é indispensável, sendo utilizados métodos de desproteinização, extração líquido-líquido ou sólido-líquido, precipitação e deslipidificação.

O uso de colunas de fase reversa minimiza a interferência de substâncias muito polares, uma vez que a sua retenção é muito baixa e praticamente igual ao volume morto da coluna.

Outra dificuldade neste campo de análise relaciona-se com a existência de metabolitos ou produtos de degradação dos próprios fármacos em análise ou de outros administrados concomitantemente com comportamento cromatográfico semelhante.

Aqui, a elevada selectividade possibilitada pelo uso de colunas de alta resolução e de solventes de diferente polaridade e selectividade oferece um grande número de possibilidades à disposição do analista.

As baixas concentrações em que os fármacos se encontram constituem um outro desafio que encontra resposta no uso de detectores de elevada sensibilidade como os fluorimétricos, electroquímicos e até de absorção espectrofotométrica no UV. O uso de técnicas diferenciadas como HPLC/MS ou HPLC/MS/MS oferece novo campo de possibilidades.

Outros problemas cuja solução encontra resposta mais ou menos difícil de alcançar com HPLC são a variabilidade intrínseca do processo de recolha, preparação e processamento final das amostras, a estabilidade do analito na matriz e a redução dos tempos de análise.

Validação de métodos

A aplicação farmacocinética dos métodos de determinação de concentrações de fármacos em matrizes biológicas na investigação e desenvolvimento quer de novos fármacos, quer de novos sistemas terapêuticos e formas farmacêuticas, implicam a necessidade da demonstração da fiabilidade dos métodos utilizados. Em particular as exigências regulamentares relacionadas com os procedimentos da avaliação da eficácia, segurança e qualidade de novos medicamentos determinam a necessidade da validação estrita dos métodos de análise. As normas de orientação (guide lines) para a validação analítica (1,2) utilizadas nos métodos de controlo de qualidade constituem apenas o pano de fundo para a validação dos métodos bioanalíticos. Elas não são suficientemente específicas para poderem ser úteis neste domínio. Elas indicam no entanto quais as características do método a determinar: especificidade/selectividade; rigor/exactidão/recuperação absoluta ou relativa; precisão: repetibilidade, precisão intermédia e robustez; linearidade ou outra forma da função de resposta e seu intervalo de aplicação; sensibilidade/limite de detecção/limite de quantificação.

É notória a ausência de uma norma de orientação específica neste domínio, embora os resultados de uma conferência sejam consensualmente utilizados na validação de métodos bioanalíticos, os quais serão extensamente referidos.

Exemplos

Serão apresentados exemplos de desenvolvimento e validação de métodos para diversos fármacos: fenitoína, fluoxetina, cisapride, ciprofloxacina, paclitaxel, doxorrubicina e doxorrubicinol.

Referências

Validation of Analytical Procedures: Methodology

Methodology the rules governing medicinal products in European Union, vol. 3A:107-117(1998)

Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology

Methodology the rules governing medicinal products in European Union, vol. 3A:119-125(1998)

Shah, V. et al.

Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, J. Pharm. Sci. 81(3):309-312(1992)

Enantioselective Capillary-GC and/ or GC-IRMS in Food Analysis

A. Mosandl, S. Asche, D. Bartschat, T. Beck, U. Hener, D. Juchelka, V. Karl, A. Kaunzinger, D. Lehmann, K. Schumacher
Institut für Lebensmittelchemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Str. 9, D-60439 Frankfurt am Main

The acceptance of foods strongly depends on their flavour and aroma impressions. Consequently, authentication of genuine flavours and spices is an important topic regarding to consumer protection and quality assurance in food production.

Both phenomena, *enantioselectivity* as well as *isotope discrimination* during biosynthesis, may serve as endogenetic parameters in the authenticity control of natural flavour and fragrance compounds, provided that suitable methods and comprehensive data from authentic sources are available. Besides site specific *natural isotope fractionation*, measured by NMR-spectroscopy (SNIF-NMR), enantioselective capillary gas chromatography (enantio-*cGC*) and comparative *isotope ratio mass spectrometry* (IRMS), have proved to be highly efficient tools in the origin specific analysis.

Nevertheless, analytical authentication of genuine food constituents is a permanent challenge, due to the complexity of food matrices. So far, online coupling techniques are the methods of choice in order to determine the authenticity of flavours, spices or alcoholic beverages.

This report is focused to the development and application of the following methods:

A. Enantioselective Analysis

- enantio-GC/MS
- enantio-MDGC/MS
- headspace solid phase micro extraction (SPME)/ enantio-MDGC/MS

B. Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

- (enantio) GC-IRMS
- (enantio) MDGC-IRMS
- headspace GC-IRMS
- Multielement analysis GC-IRMS
 ^{13}C , ^{18}O , ^2H

References

- Bartschat, D.; Wüst, M.; Hanssum, H.; Mosandl, A.;
Stereoisomeric Flavor Compounds LXXVII
3-Butylhexahydrophthalides: Simultaneous enantioselective analysis, structure elucidation and sensorial properties of the stereoisomers. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1997a, 20, 251-256.
- Bartschat, D.; Beck, T.; Mosandl, A.;
Stereoisomeric Flavor Compounds LXXIX.
Simultaneous enantioselective analysis of 3-butylphthalide and 3-butylhexahydro-phthalide stereoisomers in celery, celeriac and fennel. *J. Agric. Food Chem.* 1997b, 45, 4554-4557.
- Hener, U.; Brand, W.; Hilkert, A.; Juchelka, D.; Mosandl, A.; Podebrad, F.;
Simultaneous on-line analysis of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of organic compounds using GC-Pyrolysis-IRMS. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1998, 206, 230-232.
- Juchelka, D.; Beck, T.; Hener, U.; Dettmar, F.; Mosandl, A.;
Multidimensional gas chromatography, online coupled with isotope ratio mass spectrometry (MDGC-IRMS): Progress in the analytical authentication of genuine flavor components. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1998, 21, 145-151.
- Lehmann, D.; Dietrich, A.; Schmidt, S.; Dietrich, H.; Mosandl, A.;
Stereodifferenzierung von $\gamma(\delta)$ -Lactonen und (E)- α -Ionon verschiedener Früchte und ihrer Verarbeitungsprodukte. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1993, 196, 207-213.
- Mosandl, A. Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils. *Food Rev. Int.* 1995, 11, 597-664.
- Schumacher, K.; Asche, S.; Heil, M.; Mittelstädt, F.; Dietrich, H.; Mosandl, A. Methyl branched flavor compounds in fresh and processed apples. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 4496 - 4500.

Análise de Micropoluentes Orgânicos em Águas

Vítor Cardoso
Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA, Rua do Alviela 12, 1170 Lisboa

Durante esta última década o aumento do conhecimento relativo à contaminação da água por substâncias orgânicas levou ao alargamento do número de compostos em estudo. Mais de 2000 contaminantes químicos de todos os tipos foram encontrados na água e cerca de 750 foram identificados na água de consumo. Destes, mais de 600 eram substâncias orgânicas, incluindo muitas que são farmacologicamente activas, algumas são reconhecidas como cancerígenas ou promotores cancerígenos, e outras mostraram ser mutagénicas. Existe uma razão para acreditar que estas 600 substâncias representam apenas uma pequena fracção da matéria orgânica total presente na água de consumo. A maior parte da fracção orgânica não caracterizada consiste em substâncias não-voláteis, cuja determinação representa um desafio analítico considerável.

Nestes últimos anos têm-se criado normas que regulamentam os limites de compostos orgânicos numa água para beber. Estas regulamentações surgem como consequência do conhecimento da presença e origem destes compostos na água, assim como, das investigações epidemiológicas e toxicológicas que confirmam o seu potencial risco para a saúde pública. A protecção da saúde pública por um lado, e o cumprimento da legislação por outro, obrigam a que as entidades distribuidoras de água para consumo humano, desenvolvam métodos analíticos capazes de quantificar estas substâncias. Antes da implementação de um método analítico em rotina é exigida a sua validação. A validação de um método de ensaio deverá abranger o estudo de um número mínimo de parâmetros, como a gama de trabalho/linearidade, os limiares analíticos, a sensibilidade, a precisão e a exactidão do método.

O controlo de qualidade em análises de água é normalmente considerado uma prioridade em muitos países. Só resultados analíticos exactos permitem conclusões válidas sobre a qualidade de diferentes tipos de água e os riscos relacionados com o consumo humano. A garantia de qualidade em análises de água é, por conseguinte, uma grande preocupação para a avaliação do estado do meio ambiente ou da qualidade da água potável. Para se atingir este objectivo é necessário garantir não só uma boa reprodutibilidade do método de ensaio, como uma boa exactidão. Esta avaliação do desempenho de cada laboratório de ensaio pode ser efectuada através da participação em ensaios interlaboratoriais ou através do uso de materiais de referência certificados. Os ensaios interlaboratoriais podem ser conduzidos com diversos objectivos: identificar fontes eventuais de erros nas técnicas analíticas, medir a qualidade de um laboratório, e melhorar a qualidade de um laboratório através de um trabalho conjunto, num processo de aprendizagem mútua.

Em Portugal, toda a entidade distribuidora de água tem que estar em conformidade com o DL236/98 de 1 de Agosto, o qual, define os critérios de qualidade da água consoante a sua origem, classifica os parâmetros de qualidade dos vários tipos de águas (G1, G2 e G3) segundo a frequência de amostragem e análise, define a frequência mínima de amostragem para cada tipo de água, define para cada parâmetro quais os método(s) analítico(s) de referência, e ainda os valores máximos recomendáveis (VMR) e os valores máximos admissíveis (VMA). Dada a importância para a saúde humana da água destinada ao consumo humano, a

nível comunitário existem também normas de qualidade essenciais (Directiva 80/778/CEE) que devem ser respeitadas por todas as águas destinadas a esse fim. Deste modo, cada laboratório deve não só estar em conformidade com o DL236/98 como criar condições a nível laboratorial para cumprir as directivas comunitárias.

Electroforese Capilar na Análise de Compostos Fenólicos

L. Vilas Boas^{1,2}, M. Rosário Bronze^{2,3}

¹ Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

² Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

³ Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

INTRODUÇÃO

A Electroforese Capilar tem sido é uma técnica de análise separativa que tem sido considerada como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência o que é de certo modo válido para amostras que não tenham um número muito grande de componentes. Para amostras muito complexas, pode afirmar-se que a informação obtida pelas duas técnicas pode ser considerada complementar até porque os mecanismos de separação em que se fundamentam têm naturezas diferentes.

Comparando a instrumentação utilizada, facilmente se pode concluir que a electroforese capilar é mais simples pois as bombas utilizadas nos cromatógrafos de fase líquida são mais complicadas (e mais caras) do que as fontes de alta tensão utilizadas em electroforese capilar. Por outro lado, os sistemas de injecção de amostras são mais simples e facilmente controláveis nos cromatógrafos.

Finalmente, deve atender-se a que devido às reduzidas dimensões do diâmetro interno do capilar, a sensibilidade de alguns métodos de detecção é menor na electroforese capilar o que continua a lançar desafios aos construtores de instrumentação analítica.

Os compostos fenólicos correspondem a uma família muito numerosa de compostos e além de poderem apresentar uma enorme variedade de estruturas são bastante instáveis quimicamente pois podem estar envolvidos em reacções ácido-base, oxidação-redução, complexação com iões metálicos, oligomerização e esterificações.

Estes compostos ocorrem muito frequentemente na natureza e, em especial, nas plantas onde podem actuar como componentes estruturais, funcionais e de protecção. Em produtos alimentares, podem ser responsáveis por sabores e cores características e recentemente tem havido bastante divulgação dos efeitos benéficos para a saúde de certos produtos como por exemplo o chá e o vinho tinto em que os compostos fenólicos parecem desempenhar um papel muito significativo.

A electroforese capilar (EC) tem sido utilizada na análise de compostos fenólicos e nesta comunicação além de se fazer uma revisão de alguns desses estudos pretende dar-se um exemplo de aplicação na análise de compostos fenólicos da cortiça.

EXPERIMENTAL

As amostras foram analisados por electroforese capilar (Lauerlabs, Prince) com detecção UV a 254 nm. A separação, em solução tampão 10 mM de borato a pH=9.2, ocorreu a 35°C, a potencial de 25 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de se fazer uma comparação dos diferentes amostras, apresentam-se na figura os perfis electroforéticos obtidos nas análises de extractos de madeira de carvalho nacional (*Quercus pirenaica*) cortiça de sobreiro (*Quercus suber*) e de uma aguardente envelhecida em madeira de carvalho.

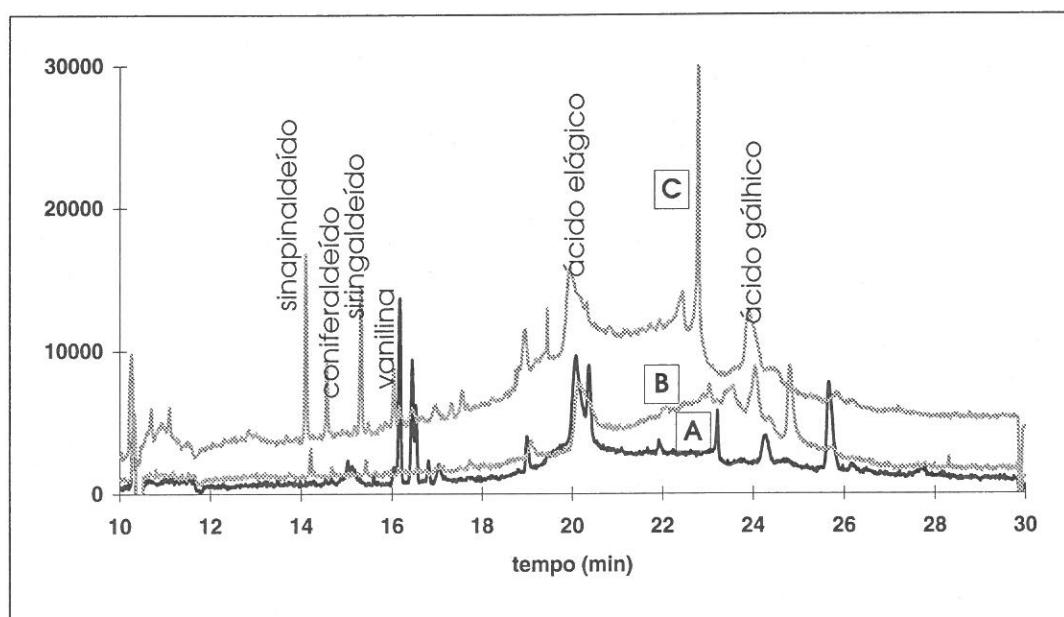


Figura – Perfis electroforéticos de: A extracto de cortiça; B – extracto de madeira de carvalho sujeita a queima forte; C aguardente envelhecida em carvalho

A comparação destes perfis permite evidenciar as semelhanças de composição entre a aguardente e os compostos extractáveis existentes na madeira de carvalho. Por outro lado, também se podem apontar algumas semelhanças entre os compostos fenólicos existentes na madeira e os da cortiça.

Neste trabalho, também se analisaram amostras de águas de cozedura de cortiça obtidas em ensaios industriais, tendo em vista o estudo da composição química destas águas bem como a possível existência destes compostos nas rolhas produzidas.

Os resultados obtidos confirmam a aplicabilidade da técnica de Electroforese Capilar na análise deste tipo de amostras.

Referências

- [1] M.R. Bronze. 1998. *Electroforese capilar: Aplicação na análise de aguardentes, vinhos e produtos afins.* Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
- [2] M. Rosário Bronze, L. F. Vilas Boas, *Analisis*, 26, 40-47, 1998.

Análise de Aminoácidos: Tudo feito ou tudo por fazer?

H.J. Chaves das Neves., Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-114 Monte da Caparica, Portugal

A importância biológica dos aminoácidos tem sido um motor para um interesse contínuo na investigação de métodos analíticos para sua separação e quantificação em matrizes complexas, com objectivos clínicos, farmacêuticos, alimentares, bioquímicos, etc.. O carácter zwetteriónico dos aminoácidos, tornando-os compostos polares e não voláteis, a variada natureza química da cadeia lateral e a geral ausência de cromóforos de elevada absorvividade, constituem um conjunto de obstáculos que tornam a aplicação de métodos cromatográficos um desafio, sob ambos os pontos de vista de separação e detectabilidade. Tais dificuldades reflectem-se claramente na existência de mais de cerca de 5.000 publicações desde 1980 até aos dias de hoje.

As duas grandes áreas de investigação cobrem a cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No primeiro caso, as metodologias buscam a preparação de derivados voláteis de qualidades cromatográficas adequadas à separação, quantificação e detecção. No segundo caso, onde o número de variáveis cromatográficas é mais largo, as técnicas mais usuais fixam-se primeiro no tipo de coluna (trocadores iónicos ou fases reversas). Embora os trocadores iónicos sejam um tipo de fase estacionária que favorece a separação dos aminoácidos não derivatizados, necessitam de cuidadoso controlo de pH em modificação contínua para a eluição de todos os aminoácidos em uma corrida, de acordo com o carácter catiônico do grupo amino terminal. Para além disto, tais colunas são susceptíveis a gradientes de pressão devido a expansão contracção do copolímero, e requerem tempos de equilíbrio elevados antes da análise. A detectabilidade dos aminoácidos é aqui a questão de fundo, requerendo a preparação de derivados activos. Os métodos em fase reversa, requerem a preparação à cabeça de derivados adequados às condições do conjunto coluna - fase móvel e igualmente capazes de serem detectados com sensibilidade adequada. Qualquer dos métodos existentes para superar estas dificuldades traz consigo dificuldades na recuperação quantitativa, exige métodos de derivatização gerais, reprodutíveis e quantitativos, riscos de introdução de materiais estranhos, na coluna levando à sua deterioração.

Acresce ainda o quase nunca falado problema do isolamento da fração aminoácido a partir da matriz analítica.

A presente comunicação procurará trazer uma contribuição crítica comparativa dos métodos mais populares, introduzir novos conceitos cromatográficos e levantar a extraordinária importância dos fenómenos envolvidos na preparação da amostra.

LC-MS no Limiar do Novo Milénio

Maria Helena Florêncio

Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande
1749-016 Lisboa

LC-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, é uma técnica hifena por excelência para análise de compostos polares e/ou térmicamente instáveis, que combina o poder separador da cromatografia líquida com o poder de identificação, sensibilidade e selectividade, da espectrometria de massa. Quando da sua introdução na década de 70, suscitou grande interesse e despertou enormes expectativas, mas as dificuldades inerentes a este tipo de acoplamento fizeram com que muitos investigadores tivessem desacreditado da sua implementação, do que resultou um certo atraso no seu desenvolvimento. Estas dificuldades foram aliás bem expressas por Patrick Arpino num artigo sob a designação “convite para um casamento” publicado em 1982 na revista Trends in Analytical Chemistry, no qual uma figura representando o “namoro” entre um pássaro e um peixe ilustrava a incompatibilidade aparente da junção fase líquida - fase gasosa. O desenvolvimento da técnica de LC-MS prosseguiu no entanto e embora este desenvolvimento não tenha ocorrido no sentido de obtenção de uma interface universal, como foi o caso em GC-MS, várias interfaces foram surgindo, capazes de dar resposta com rapidez e eficiência a problemas analíticos complexos nas mais variadas áreas.

Cada uma das interfaces comercialmente disponíveis tem as suas vantagens e desvantagens, podendo cada uma delas ser particularmente adequada para um determinado tipo de compostos. A denominada *introdução líquida directa, DLI*, e a *correia de transporte, ‘moving belt’*, foram das primeiras interfaces desenvolvidas, mas problemas intrínsecos à sua constituição fizeram com que tivessem uma aplicação limitada e tivessem sido usadas num número restrito de laboratórios. O desenvolvimento da técnica de *termospray*, veio modificar drasticamente esta situação, levando ao reconhecimento das potencialidades de LC-MS e a uma aceitação mais generalizada desta técnica. Com o advento de novas interfaces como a de *feixe de partículas, particle beam*, *FAB de fluxo contínuo, CFFAB*, ou *Frit FAB* e posteriormente *electrospray*, LC-MS passou a ser usada como técnica de rotina. Outros desenvolvimentos surgiram, tais como o *spray de iões, ion spray*, também designado por *electrospray assistido por nebulização*, em que se usa um gás auxiliar de dessolvatação, o qual também é usado com a finalidade de impedir a formação de ‘clusters’ de iões.

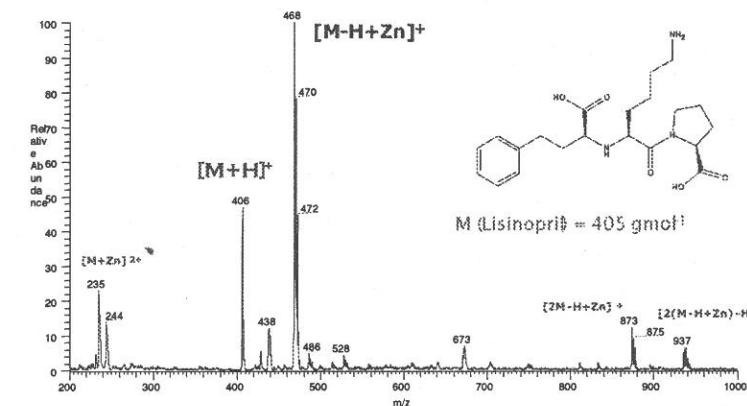
É também importante no contexto de LC-MS a *ionização à pressão atmosférica, APCI*, que se pode considerar uma precursora das técnicas de *electrospray* e *ionspray*. APCI é uma técnica mais energética que *electrospray* e embora seja igualmente eficiente para ionização de pequenas moléculas polares, não se revela adequada para análise de biomoléculas uma vez que dá origem à decomposição das mesmas.

Pode considerar-se que LC-MS, usada presentemente como técnica de rotina nos mais variados laboratórios e com virtudes amplamente reconhecidas, é uma técnica que atingiu já a maturidade no limiar do novo milénio. E se não conseguiu ainda a aceitação universal obtida pela sua congénere GC-MS, é de prever que muito em breve o atinja, tendo em conta a evolução tecnológica que se tem vindo a registar durante a última década. Como exemplos podem citar-se:

- a nova geração de interfaces ao nível de *termospray*; *feixe de partículas, APCI*; *electrospray* e *ionspray*
- o acoplamento de electroforese capilar, *CZE*
- LC-MS-MS on line
- o desenvolvimento de instrumentação nas vertentes informática e de miniaturização.

No que se refere a este último ponto, tanto HPLC capilar, ao nível da cromatografia, como micro- e nano-spray/electrospray, ao nível da espectrometria de massa, vieram revolucionar a análise no domínio da separação e identificação de amostras de dimensões cada vez mais pequenas.

Na figura seguinte é apresentado um exemplo de um espectro de massa obtido com *nanospray* numa amostra com a concentração de $25\mu\text{M}$.



Comunicações Orais

Inverse Gas Chromatography : A powerful technique

Mohamed Naceur Belgacem

Universidade da Beira Interior, Departamento do Ciéncia e Tecnologia do Papel,
6200 Covilhã, Portugal, E-mail : belgacem@alpha2.ubi.pt

This paper deals with the possible applications of Inverse Gas Chromatography (IGC) in the characterisation of organic and inorganic substances [1,2]. First, the historical development of the technique, its principle, its advantages and limitations, the experimental methodology it requires, the instrumentation used and the calculation procedures adopted to exploit its data, as well as some practical aspects of this technique will be presented, then the different parameters which could be measured using IGC will be listed and examples will be given from the literature. Thus, the following characteristics will be treated :

- 1- The specific areas of powders and fibres,
 - 2- The dispersive component of the surface energy and the acid-base properties of the solid surfaces,
 - 3- The glass transition temperature of some polymers, and
 - 4- The solubility parameter.
-
- 1- The classical method used to characterise the surface area of powders and fibres is the BET technique, based on the determination of the adsorption isotherms of different gases (nitrogen, argon, krypton etc...) on the solid surface [3]. IGC can also be applied to these substances, since it allows to obtain the adsorption isotherms of a given gas on the surface of the investigated products. It was successfully used to determine the surface areas of cotton, cellulosic fibres, etc... [4-6]
 - 2- The surface free energy (dispersive and acid-base) of solids is usually evaluated using static and dynamic contact angle (CA) measurements [7-9]. However, this technique is not adapted to porous or rough solid surfaces or to materials such as fibres and powders which cannot be converted into continuous flat surfaces. The macroscopic character of the CA technique can moreover be the source of erroneous evaluations of surface properties. Examples in this context are (i) the partial degradation of polymers during the processing of films or plates which will influence CA values more than the actual surface composition; (ii) the atmospheric contamination of high-energy surfaces like metals, oxides, etc. which again gives rise to abnormally large changes in CA values and (iii) the partial migration to the surface of additives present in polymeric materials. IGC was used in this purpose and it allowed to determine the surface properties of fibrous materials like cellulose, glass, carbon and aramid fibres and powderous materials like synthetic polymers, lignin, organic and inorganic pigments and fillers. These parameters were obtained from measurements at infinite dilution conditions [2].

- 3- Glass transition temperature (Tg) is usually determined by differential scanning calorimetry, dynamic mechanical analyses, thermal analyses, dilatometry et... IGC was also used to determine the Tg of some synthetic polymers [1].
- 4- The solubility parameter of cellulose was also determined by IGC, and found to be in good agreement with those determined by using other common methods [10].

REFERENCES :

1. D. R. Lloyd, T. C. Ward and H. P. Schreiber, *Inverse Gas Chromatography*, ACS Symposium Serie, # 391, American Chemical Society, Washington D. C., 1989.
2. M. N. Belgacem and A. Gandini, in "Interfacial Phenomena in Chromatography", (E. Pefferkorn ed.) Marcel Dekker, New York, 1999, Chapter 2, pp. 41-124.
3. S. Brunauer, P. H. Emmett and E. Teller, *J. Amer. Chem. Soc.* 60, 309 (1938).
4. P. Tremaine and D. G. Gray, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 71, 2170 (1975).
5. U-B. Mohlin and D. G. Gray, *J. Colloid Interface Sci.* 47, 747 (1974).
6. G. M. Dorris and D. G. Gray, *J. Colloid Interface Sci.* 71, 93 (1979).
7. M. E. Schrader and G. I. Loeb, *Modern Approaches to Wettability: Theory and Applications*, Plenum Press, London, 1992.
8. S. Wu, *Polymer Interface and Adhesion*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1982.
9. F. M. Fowkes, *Adv. Chem. Ser.* 43, 99 (1964).
10. H. L. Lee and P. Luner, *J. Wood Chem. Technol.* 11, 247 (1991).

Detecção Electroquímica de Compostos Fenólicos em HPLC: Conversão em voltamogramas hidrodinâmicos cíclicos e simulação de voltametria integrada

Rui Lopes Marques^{1,2}, Mário C. Patrício³, Luís Vilas Boas^{1,2}

¹ - Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ² - Instituto Superior Técnico, ³ - Instituto de Biologia Experimental Tecnológica

1. – INTRODUÇÃO

A aplicação de detecção electroquímica em HPLC é uma técnica muito útil para compostos electroquimicamente activos apresentando vantagens significativas a nível de sensibilidade e selectividade [1]. A maioria dos artigos publicados descreve a utilização de amperometria a potencial constante, voltametria integrada e coulometria [2]. A utilização de um detector electroquímico em série com detector de diódos (absorção no ultravioleta e visível) potencial a identificação e quantificação dos componentes de amostras complexas, pois permite a aquisição de informação sobre o espectro de UV-VIS, tempo de retenção e características electroquímicas de cada molécula.

Neste trabalho, desenvolvemos uma aplicação informática que, a partir dos dados obtidos em aquisição contínua de intensidades de corrente (i) em função do tempo (t) a partir do detector electroquímico, efectua a sua decomposição num perfil tridimensional $i=f(V,t)$ (V = voltagem aplicada). A partir deste perfil, podem obter-se cromatogramas a potencial constante ou voltamogramas (hidrodinâmicos) cíclicos. É também possível simular voltametria integrada.

É descrita a aplicação deste procedimento à separação de uma mistura de oito compostos fenólicos.

2. – MÉTODOS

Usou-se um cromatógrafo Philips com um detector de fotofodos (Philips PU4021) ligado em série a um detector electroquímico Dionex (ED40) com eléctrodo de carbono vítreo programado para uma variação linear de -1.0 V a 1.0 V em 1.00 s (e retorno nas mesmas condições). Os dados do detector electroquímico foram capturados à frequência de 50 Hz com um conversor analógico/digital e o programa 4880 (Unicam).

Foi ensaiada uma mistura de oito padrões: ácidos gálico (1), vanílico (2), cafeíco (3) e ferúlico (4), siringaldeído (5), miricetina (6), quercetina (7) e luteolina (8).

O programa de tratamento de dados foi elaborado em Visual Basic for Applications para Excel (Microsoft Corp). A representação gráfica foi efectuada com SigmaPlot (Jandel Scientific).

3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 ilustra-se a comparação entre a detecção electroquímica e por absorção no UV.

O vasto conjunto de dados obtido com o detector electroquímico foi tratado no sentido de tirar partido da informação e na figura 2 apresenta-se uma representação 3D de i vs (V,t) para dar uma perspectiva global do conjunto de resultados.

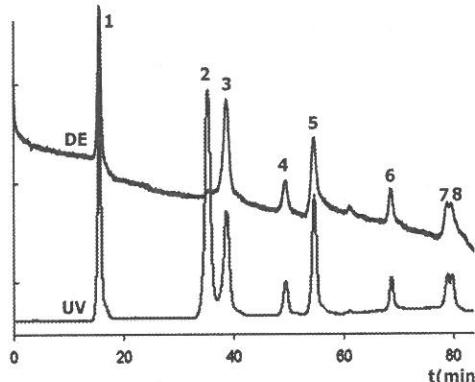


Figura 1 – Comparação entre a detecção por UV (254 nm) e a detecção electroquímica (0.76 V no varrimento anódico).

Fazendo cortes a potencial constante obtém-se cromatogramas como, por exemplo, o da figura 1. Por outro lado, tomando os valores de intensidade e potencial durante um ciclo completo de voltagem podem obter-se voltamogramas hidrodinâmicos cíclicos, tal como se ilustra na figura 3.

Pode ainda simular-se voltametria integrada a fim de optimizar as condições de integração, o que permite reduzir o número de ensaios experimentais a realizar.

4. – REFERÊNCIAS

1 – I.N.Acworth e M.Bowers, An introduction to HPLC-based electrochemical detection: from single electrode to multi-electrode arrays. In: Progress in HPLC, Volume 6, I.N.Acworth, M.Naoi, S.Parvez e S.Parvez (eds.) VS Press, The Netherlands (1996).

2 – I.N.Acworth e P.H.Gamache, American Lab., 5, 33-37, 1996.

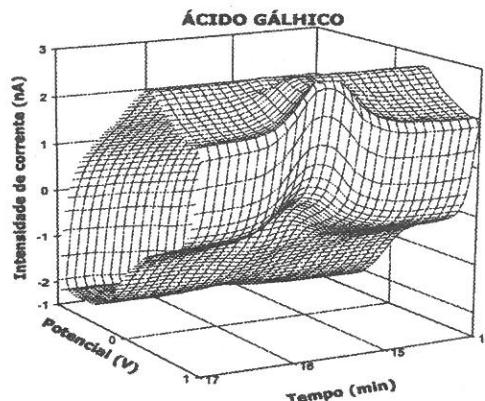


Figura 2 – Representação 3D dos valores obtidos com o detector electroquímico.

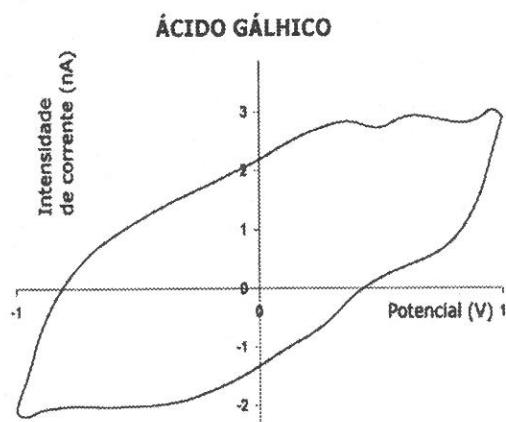


Figura 3 – Voltamograma hidrodinâmico cíclico obtido ao tempo de retenção do ácido gálico.

A Utilização de Factores de Correlação na Análise Quantitativa de Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos por Cromatografia Gás-Líquido

Ana M. Partidário

INETI-DTIA, Estrada do Paço Lumiar, 1649-038 Lisboa

Introdução

A análise por cromatografia gás-líquido dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) constituintes de gorduras e óleos animais ou vegetais requer, na maioria das situações, a utilização de factores de correção (F.C.). No caso particular das gorduras ou óleos que possuem ácidos gordos com número de átomos de carbono inferior a 8 ou com funções secundárias a sua utilização torna-se indispensável. Para além disso sempre que se pretenda uma melhor exactidão de resultados, é conveniente a utilização de F.C. na conversão das percentagens em área dos picos cromatográficos em percentagens em massa de constituintes. As áreas dos picos dos FAME detectados em detector de ionização de chama (FID) não são proporcionais às suas massas mas sim à massa dos átomos de carbono activos, daí que seja inaceitável a situação, muitas vezes verificada, da não utilização de qualquer tipo de correção (teórica ou prática). A utilização de misturas de calibração permite determinar F.C. empíricos os quais englobam os erros sistemáticos ocorrentes durante o processo analítico. Em situação ideal, estes valores deverão ser próximos dos valores teóricos, que se calculam com base no número de átomos de carbono e nas insaturações da molécula do éster metílico de ácidos gordos (3). A Norma ISO 5508 (2) refere a utilização de uma mistura de referência de composição conhecida para o cálculo dos F.C. a qual deverá ser analisada em condições operatórias idênticas à amostra. Esta indicação não é suficiente para tomar evidente a necessidade de utilização de misturas de referência com composição semelhante à da gordura ou óleo em análise. Este pormenor, por vezes descurado, conduz na maioria das situações a graves erros quantitativos. Também a utilização de misturas de padrões comerciais cuja composição, vem em geral, expressa em relação à massa dos ésteres metílicos de ácidos gordos, pode conduzir a erros na quantificação dos ácidos gordos da gordura de leite ou queijo, visto que para estes produtos os resultados são, por convenção, expressos em relação à massa do total de ácidos gordos (1). Nesta comunicação pretende-se alertar para estas e outras situações, que contribuem para a diminuição da exactidão na determinação da composição quantitativa de ácidos gordos constituintes de gorduras e óleos animais e vegetais.

Parte Experimental e Resultados

Os F.C. apresentados foram calculados com base nos resultados da análise cromatográfica de 3 materiais de referência certificados de composição semelhante a gorduras e óleos comestíveis de uso comum: mistura de óleo de soja e milho (BCR 162), mistura de gordura corporal de bovino e suíno (BCR 163) e gordura de manteiga anidra (BCR 164) e ainda, numa mistura comercial contendo quantidades conhecidas de 37 ácidos gordos de C4 a C24:1 (Sigma). Os FAME foram analisados em coluna de sílica fundida com 60 m de comprimento, 0.32 µm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme (50% cianopropilmetilpolisiloxano). Temperatura da coluna: 70°C – 195°C (10 min.) – 220°C (20 min.), à razão de 5°C/min. Temperaturas do Injector e Detector, respectivamente 195°C e 210°C. Gás vector: Hélio à pressão 70 kPa. Injeção com divisão de fluxo na razão 1/10.

Em condições ideais os F.C. deverão decrescer desde C4 até C18, tal como se verifica para os F.C. teóricos. Nos resultados obtidos são evidentes alguns desvios à situação ideal, tendo-se observado que :

- a utilização de seringas de 1 μ l (amostra dentro da agulha), conduziu a maiores perdas dos ácidos mais voláteis (C4 e C6) e, consequentemente, os F.C. são superiores aos obtidos quando da introdução da amostra com seringa de 10 μ l;
- a utilização de seringas de 10 μ l (amostra no barril) sobrevalorizou os ácidos de cadeia média (C8 a C14), o que é evidenciado pelos F.C. inferiores à unidade obtidos. Pelo contrário, os ácidos de maior massa molecular, apresentaram F.C. superiores à unidade, em consequência de discriminações na própria seringa (retenção no barril);

As diferenças obtidas para os F.C., calculados nas mesmas condições analíticas mas distanciados de 9 meses, não contrariam as constatações anteriores.

Finalmente verificou-se que para os mesmos ácidos gordos, a utilização de materiais de referência com composição mássica relativa diferente conduziu também a diferentes valores para os respectivos F.C.

Conclusões

Os F.C. deverão ser calculados com base em materiais de referência de composição conhecida e exactamente nas mesmas condições das amostras que irão ser analisadas. Para além disso, os seguintes factores deverão também ser considerados:

- 1- A obtenção da melhor correcção possível das concentrações dos diferentes ácidos passa pela utilização de misturas de referência de composição o mais semelhante possível à amostra. Uma das grandes fontes de erro na análise quantitativa dos ácidos gordos constituintes, é a utilização de misturas comerciais nas quais as percentagens mássicas dos componentes não se aproximam da composição da amostra.
- 2- A utilização de seringas de êmbolo na agulha (1 μ l) conduz a maiores perdas dos ácidos mais voláteis, mas a melhores resultados nos ácidos de cadeia média e longa.

3- A utilização de seringas de 10 μ l conduz a discriminações dos ácidos mais pesados, o que pode ser compensado por uma técnica de injecção mais lenta (agulha quente). Esta situação não é apropriada para gorduras como por exemplo do leite e seus produtos, pois conduz a perdas dos ácidos mais voláteis, em particular do butírico.

O cálculo periódico (no mínimo 2 vezes/ano) de novos F.C. mesmo quando não se verifiquem alterações no sistema analítico deverá ser uma prática corrente. Situações como a substituição de uma coluna cromatográfica, mesmo que por coluna com iguais especificações, alterações da razão de repartição, mudança de seringa, etc., justificam a reconfirmação dos F.C.

Bibliografia

- 1 - BCR information, 1993, Community Bureau of Reference. Reference Materials, Report EUR 15277 EN
- 2 - 150 5508, 1995, Animal and Vegetable Fats and Oils- Analysis by g.c. of methyl esters of fatty acids
- 3 - Wolff, R.L., 1989: Le Lait, 69, 33-46.

Trace Analysis of Pesticide Residues in Ground and Drinking Waters by High Performance Thin-Layer Chromatography with Automated Multiple Development

Holger Hegewald*, Gottlieb Basch# (*LACROME - Laboratório de Análises Cromatográficas, Lda.; Rue Dr. César Batista, 6-D, 7000-715 Évora, Portugal, # Universidade de Évora, Departamento de Fitotecnia, Largo dos Colegiais, 2, 7002-554 Évora)

Classical thin-layer chromatography (TLC) is a simple, inexpensive and flexible method of chromatographic analysis requiring little instrumentation. It is suitable for separation of simple mixtures and for qualitative identification or semiquantitative analysis of samples.

Whereas gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) have gained wide acceptance as fully instrumentalized, highly efficient methods, thin-layer chromatography has long been considered a technique that only provides raw qualitative and quantitative data.

After some time of stagnation thin-layer chromatography – now also called planar chromatography - has gained increasing importance as an analytical separation technique, which is a result of the advances in instrumentation and automatization. The applicability of TLC was also enhanced by the development of new efficient, fine-particle adsorbents and ready-to-use layers.

Modern high performance thin-layer chromatography (HPTLC) is nowadays capable of producing high-resolution separations and quantitative analysis with accuracy, precision and sensitivity rivalling those of GC and HPTLC.

The advantages of TLC/HPTLC include their flexibility due to the fact that there are no restrictions in the choice of stationary and mobile phases. Analysing samples without or with minimal cleanup, including those containing components that remain sorbed to the start position of the layer, is no problem for planar chromatography. The possibility of separating up to 72 samples and standards simultaneously on a single HPTLC plate is another advantage, leading to high throughput, low cost analysis and very low solvent usage per sample. After separation the analytical information can be stored on the TLC layer for a longer period of time. Separated substances can be subjected to subsequent analytical spectroscopic methods like e.g. UV/VIS, IR, FTIR, MS, and RAMAN.

Modern planar chromatography plays an important role in the quality control of foodstuffs and in pharmaceutical analysis. It is laid down by the European Pharmacopoeias as the official method for testing the identity and purity of medical drugs. It has found particular application in the field of environmental analysis, e.g. in trace analysis of pesticide residues in ground and drinking waters. This is due to the recent introduction of a new development method – the Automated Multiple Development with gradient elution (AMD-HPTLC). The authors will focus their presentation on this variant of HPTLC that offers an appreciably better separation performance than conventional planar chromatography with 20 to 30 baseline separations per chromatogram. The AMD development takes place in usually 10 to 30 individual runs. Each run is a constant increment (between 1 and 3 mm) longer than the previous. Furthermore changing the polarity of the mobile phase for each successive run generates a stepwise gradient. Using this method zone focusing is achieved. Between the individual runs the plate is vacuum-dried to restore its capillary forces. The entire development process is completely automated and computer controlled. AMD is the only method that offers a reproducible gradient elution on silica gel. The method allows the quantitative analysis of hundreds of pesticides from different classes with an instrumental detection

Comparação dos Métodos “SPME” e “SDE” na Análise de Compostos Responsáveis pelo Aroma do Vinho

Luis Vaz Freire, Angela M.S. Relva e Ana M. Costa Freitas

CQFB do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia 2825-114 Caparica

RESUMO

O objectivo deste trabalho é proceder à escolha de um método que permita quantificar a presença de um conjunto alargado de compostos orgânicos presentes nos vinhos. Apresenta-se um estudo comparativo entre o método de microextracção em fase sólida (SPME) e o processo de extração por solvente e destilação simultâneos (SDE), seguidos de cromatografia em fase gasosa. Estes métodos foram comparados em termos de exactidão, precisão inter-ensaio e limites de detecção, utilizando soluções padrão de uma série de compostos orgânicos conhecidos como fazendo parte da matrix a estudar. Para o método de SPME foram estudados dois métodos analíticos; (1) utilizando um padrão interno e uma curva de calibração (2) recorrendo ao método das adições. A comparação dos resultados obtidos por estes dois métodos mostra que apesar da utilização do método das adições permitir evitar o efeito de matrix, o erro na determinação, para um intervalo de confiança de 95% é de tal maneira elevado, que os resultados apresentaram uma imprecisão inaceitável. A utilização de um padrão interno com recurso a rectas de calibração revelou resultados com uma precisão muito maior, o mesmo se tendo verificado em relação à exactidão. O método é linear pelo menos para três ordens de grandeza com coeficientes de correlação normalmente de 0,996 e apresenta limites de detecção que variam para cada composto e vão desde 0,036 a 0,169 ppm, considerando três vezes o desvio padrão da ordenada na origem.

As mesmas soluções foram analisadas por SDE, tendo-se verificado que este método apresenta uma precisão inter ensaio semelhante ao SPME, verificando-se no entanto recuperações muito baixas. Este problema foi ultrapassado recorrendo à introdução de um padrão interno na solução a extraer e utilizando uma curva de calibração ou, pela introdução do factor de recuperação, previamente determinado, aos cálculos finais. A figura 1 mostra um estudo comparativo entre os métodos SPME e SDE (ambos com recurso a padrão interno e curvas de calibração). A curva apresenta um declive $b = 0,75$ e uma ordenada na origem $a = 0,46$. Os intervalos de confiança para um nível de significância $P = 0,05$ permitem concluir que, a ordenada na origem, não difere significativamente do valor "ideal" de zero; o mesmo não acontece com o declive que é significativamente diferente de 1, o que traduz a existência de um erro sistemático nos declives das rectas correspondentes a cada um dos métodos.

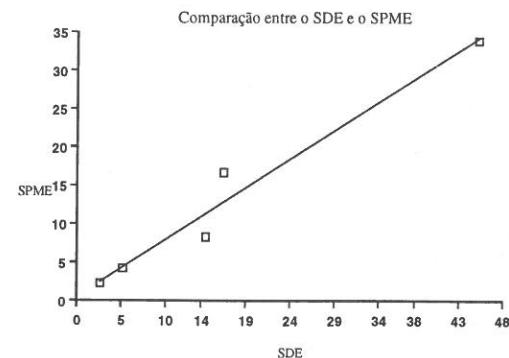


Figura 1 Estudo comparativo entre os métodos SDE e SPME (ambos com recurso a padrão interno) e para soluções padrão de linalool de 4,17, 8,33, 16,67, 33,33 e 66,67 ppm. Os intervalos de confiança para $P = 0,05$ são: $a = 0,4634 \pm 3,997$ e $b = 0,7478 \pm 0,1761$

Serão igualmente apresentados resultados da aplicação destes dois métodos a amostras de vinho moscatel produzido em condições controladas.

Éteres Bifenílicos Quirais: Resolução enantiomérica em fases derivadas de polissacarídeos (HPLC)

Madalena Maria Magalhães Pinto^a, Maria Elizabeth Tiritan^{a,b},
Carlos M. M. Afonso^a, Quezia B. Cass^c

(a) Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha, 164
4050-047, Porto, Portugal

(b) I.S.C.S-Norte, Rua Central de Gandra, 1317, 4580 Gandra, Paredes, Portugal

(c) Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Cx Postal 676, 13565 - 905 - São Carlos, SP - Brasil.

2- Madalena Pinto, Elizabeth Tiritan, Paulo Pinho and Honorina Cidade. Synthesis and Anti-inflammatory Activity Study of Chiral Biphenyl Ethers. 3º Encontro Nacional de Química Orgânica, Universidade da Beira Interior, Corvilhã, 23-26 de Julho de 1999, p. 38.

3- Quézia B. Cass, M. Elizabeth Tiritan, Ana Lúcia Bassi, Silvana A. Callafatti e Ana Luiza G. Degani, Discriminação Quiral por CLAE em Carbamatos de Polissacarídeos: Desenvolvimento, Aplicações e Perspectivas. *Química Nova*, 20(1), 1996, 49-57.

Agradecimentos

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (Unidadade de I &D N° 226/94); FEDER e Praxis XXI .

Integrado no trabalho de investigação do CEQOFFUP, que visa a obtenção de derivados xantónicos por via sintética, foram obtidos como intermediários vários éteres bifenílicos quirais (Derivação do método de Ullmann¹, Fig. 1).

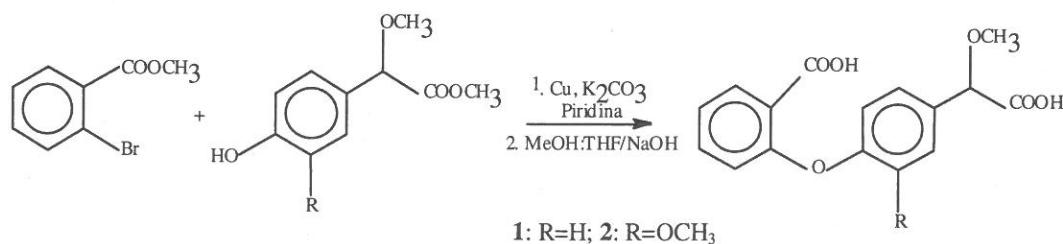


Figura 1: Síntese dos éteres bifenílicos.

Estes compostos apresentam estruturas muito semelhantes as de alguns profenos, nomeadamente o naproxeno e o fenoprofeno e, em ensaios preliminares, demonstraram também actividade anti-inflamatória². Na medida em que os compostos obtidos correspondem a misturas racémicas, é de extrema importância um método para resolução dos enantiómeros, possibilitando assim avaliar a actividade com os enantiómeros isolados.

Este trabalho descreve a resolução enantiomérica por HPLC dos éteres bifenílicos em fases estacionárias quirais de derivados de amilose e celulose. Os resultados obtidos com os produtos 1 e 2 na forma de ésteres são promissores para separação preparativa. Das fases estacionárias quirais utilizadas, a fase derivada de amilose foi a que apresentou os melhores resultados frente aos derivados na forma de ésteres. Estes compostos nunca tinham sido sujeitos a este método de resolução enantiomérica. As fases estacionárias quirais utilizadas neste trabalho são resultados de investigações anteriores que demonstraram que o uso de sílica microporosa melhora tanto a eficiência como a durabilidade da coluna³.

Referências

- 1- Jackson T. W., Boyd J. R., Froelich L.L., Gaspinski D. M., Mallett B. E. and Sawyer . J. S.; Design, Synthesis; and Pharmacological Evaluation of Potent Xanthone Dicarboxilic Acid Leukotriene B₄ receptor antagonist. *J Med. Chem.* 1993, 1726-1734.

Thioacidoacidolysis-HPLC Characterisation of Oligomeric and Polymeric Procyanidin Fractions from Grape Seeds

Sun B.S.¹; Spranger M.I.¹; Roque do Vale F.²; Ricardo-da-Silva J.M.^{1,3}

¹Estação Vitivinícola Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária,
2560 Dois Portos, Portugal, Tel. 351.61.712124, e-mail: inia.evn@mail.telepac.pt

²Student of the Instituto Superior de Humanidades e Tecnologias, 1399 Lisboa, Portugal.

³Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 1399 Lisboa, Portugal, Tel.
351.1.3638161, Fax 351.1.3602036, E-mail: jricardosil@isa.utl.pt

Procyanidins are important phenolic compounds owing to their contribution to sensory properties of plant-derived foods and to their various biological activities, especially their powerful antioxidant activity and their oxygen free radical scavenger capacity. In our previous work, the methods for isolation of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds, both in a analytical scale using C₁₈ Sep-Pak cartridges (Sun *et al.*, 1998) and in a preparative scale by an open column (20 × 2.5 cm) packed with LiChroprep RP-18 (Sun *et al.*, 1999), were established. However, the chemical properties of the two procyanidin fractions were only partially characterised (Sun *et al.*, 1998).

In this work, the ranges of polymerisation degree (DP) in the oligomeric and polymeric procyanidin samples were determined. Furthermore, both samples were fractionated by normal-phase HPLC to obtain various sub-fractions (Fig 1). Each sub-fraction was then submitted to acid-catalysed degradation in the presence of toluene- α -thiol followed by reverse-phase HPLC analysis, which permits to quantify the terminal units (released as monomeric flavan-3-ols) and extension units (released as toluene- α -thiol derivatives) of procyanidins and thus to calculate the mean DP (mDP) of procyanidins in each sub-fraction (Table 1).

Since all dimeric procyanidins were present in the oligomeric sample as confirmed by reversed-phase HPLC in our previous work (Sun *et al.*, 1998), we may roughly estimate, according to table 1, that the DP of oligomeric procyanidins ranges from 2 to 17-18. Note that the mDP of the first sub-fraction (I) of oligomeric procyanidins was about 3, not 2, because the method only estimated the mean DP of each sub-fraction.

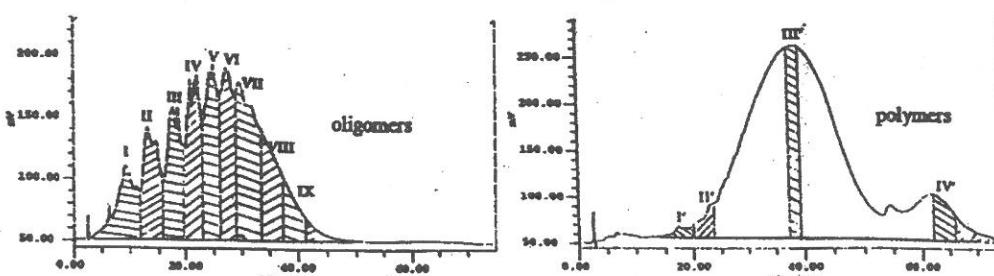


Fig.1 Normal phase HPLC chromatograms of oligomeric and polymeric procyanidin samples

Table 1. Mean DP (mDP) of procyanidins of the sub-fractions presented in Fig. 1.

	oligomeric procyanidins									polymeric procyanidins			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	I'	II'	III'	IV'
mDP*	3.1	4.9	6.5	8.5	9.9	11.4	12.8	15.3	17.4	10.0	12.9	29.6	33.6
SD**	0.0	0.2	0.3	0.2	0.4	0.3	0.6	0.3	0.6	1.1	0.7	0.2	1.2

* Mean values of two replicate measurements; **SD = standard deviation

Similarly, the range of DP of polymeric procyanidins could also roughly be estimated to be from 9-11 to 32-35. Otherwise, the mDP of the last estimable sub-fraction of oligomeric procyanidins (sub-fraction IX) is not the same as that of the first sub-fraction of polymeric procyanidins (sub-fraction I'), indicating that there was no absolute or exact border between oligomeric and polymeric procyanidins. However, the overlap between these two samples was relatively slight.

These results provide useful information to further study these oligomeric and polymeric procyanidin samples.

Sun B.S., Leandro M.C., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger M.I., 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerisation, *J. Agric. Food Chem.* 46, 1390 - 1396.

Sun B.S., Belchior G.P., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger M.I., 1999. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds, *J. Chromatogr. A* 841, 115 - 121.

Factores Interferentes na Quantificação dos Alcalóides Maioritários do Tabaco

Arlete Matos^a, M. Conceição Oliveira^b, M. Graça Lourenço^a

^a Centro de Investigação Ciências Agrárias Tropicais - DAIAT - Instituto Superior de Agronomia - Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex - Portugal

^b Centro de Espectrometria de Massa - Complexo I - Instituto Superior Técnico
Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa Codex - Portugal

A Cromatografia Capilar de Alta Resolução (HRGLC), com recurso a colunas polares de polietileno glicol, de base ligada e basificada, tem sido a técnica mais utilizada na separação e quantificação dos alcalóides maioritários do tabaco e fumo do tabaco [1].

É de realçar a conhecida absorção do alcalóide nornicotina [2] neste tipo de fases e a consequente variabilidade dos resultados obtidos na sua quantificação.

Em extractos de alcalóides de tabaco, obtidos por diversos métodos de extracção verifica-se a existência de compostos que interferem na sua quantificação. Neste trabalho evidencia-se a localização, em diferentes colunas, dos compostos interferentes e identificam-se pela técnica hifena de GC-MS.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL:

Padrões de alcalóides e padrões internos; Tabacos curados tipo Burley e Flue-cured.

MÉTODOS:

EXTRACÇÃO: Líquido-Líquido, Soxhlet e Ultrasons

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO: HRGLC e GC-MS

Equipamento:

- Banho de Ultrasons Elma, Transsonic T 660/H; Cabeça termostatizada Clifton.
- Cromatógrafo HP 5890 série II, Injector *split/splitless*, Detectores FID e NPD, Integrador HP 3396 série II, Peak 96.
- Espectrómetro de Massa HP 5070 acoplado a Cromatógrafo HP 5890 série II, interface directa e Livraria NBS GERAL.
- Colunas: Supelcowax (30m x 0,25mm x 0,25µm); Superox II (30m x 0,32mm x 0,25µm); CP Wax 51 CB (30m x 0,32mm x 0,25µm) e PTA 5 (30m x 0,32mm x 0,5µm)

Condições de Trabalho:

- Injector 250°C; Detector 280°C e 300°C; Temperatura do forno: isotérmica a 150°C, 160°C e 200°C e programada de 160°C a 240°C ou 280°C (4°C/min); velocidade linear do gás de arraste (He) 20, 30, 35 e 39; Split: 1:20; volumes de injeção 0,5 a 3µl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em cromatogramas de extractos de alcalóides do tabaco verifica-se a presença de 2 compostos que interferem na quantificação da nicotina e da nornicotina e anabasina. O composto interferente com a nicotina era previsível ser o neofitadieno [3] o que foi confirmado por GC-MS.

No que reporta ao composto interferente com a nornicotina e anabasina, partindo da informação da livraria do Sistema GC-MS que apontava para tratar-se do éster metílico do ácido hexadecanóico, preparou-se este composto, injectou-se no sistema GC-MS e confirmou-se a sua localização e identificação. Fizeram-se ainda ensaios de sobrecarga do éster aos extractos de alcalóides e ensaios com o detector NPD.

É de realçar que em múltiplas experiências realizadas com colunas polares se verificou que a posição relativa destes compostos interferentes em relação aos alcalóides é variável, numa dada coluna, com as condições cromatográficas, havendo situações em que o neofitadieno se sobrepõe à nicotina e o éster à anabasina ou à nornicotina.

Nos tabacos tipo Burley o éster metílico do ácido hexadecanóico está presente em quantidades da ordem dos alcalóides nornicotina e anabasina enquanto nos tabacos flue-cured aparece em quantidades muito superiores à dos alcalóides.

Ao optimizar-se as condições cromatográficas para a separação dos alcalóides maioritários do tabaco em colunas polares, deverá ter-se em atenção a localização dos compostos interferentes para evitar quantificações erráticas.

REFERÊNCIAS:

1. Lourenço, M.G.; Moreira, A.P., *Rev. Ciênc. Agr.*, XVIII (4) (1995) 85-95.
2. Severson, R.F. *et al.*, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 111-121.
3. Wagner, J. R.; Thaggard, N.A. , *J. AOAC*, 62 (4) (1979) 229-236.

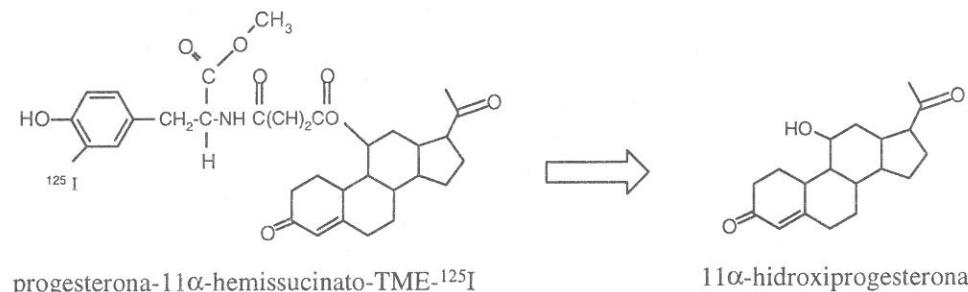
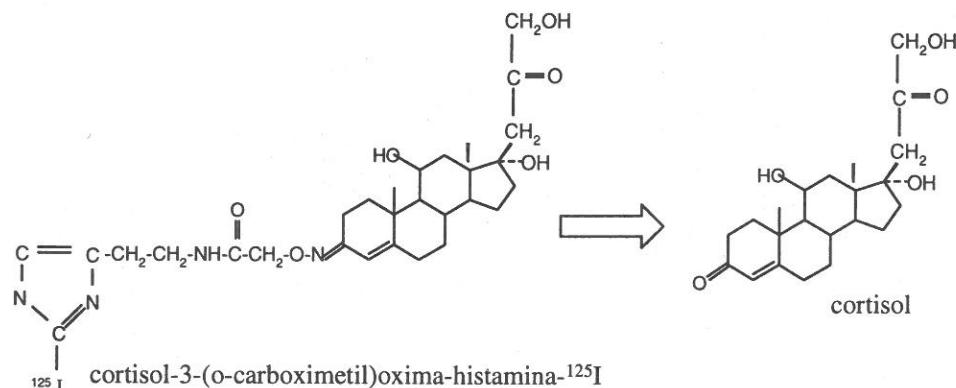
Hormonas Esteróides Radioiodadas com Interesse Biomédico: Síntese química e purificação por HPLC

M.C. Melo e Silva, A. Rodrigues e L. Patrício
Instituto Tecnológico e Nuclear, Sacavém

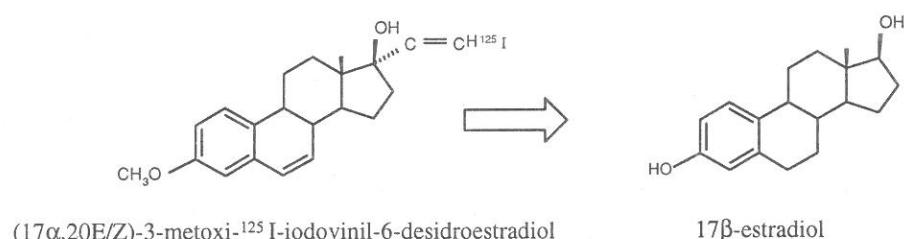
Compostos isotopicamente marcados têm desempenhado um papel bastante importante em Medicina Nuclear na investigação de uma grande variedade de situações clínicas. Moléculas esteróides marcadas com radionuclídos emissores γ , tais como ^{123}I , ^{125}I e ^{131}I , têm tido nas últimas décadas um impacto significativo quer no doseamento de hormonas no soro quer na detecção de tumores [1]. A síntese de esteróides radioiodados, para serem usados como traçadores, envolve a incorporação de um átomo de iodo radioactivo na molécula biologicamente activa. O método de síntese difere de acordo com a sua natureza química e também com a aplicação clínica a que se destinam.

No âmbito do nosso programa de desenvolvimento de compostos radioiodados foram sintetizados alguns derivados de esteróides, cujas vias de síntese química a seguir se apresentam.

– Conjugação de um grupo prostético (histamina e tirosinato de metilo)



– Substituição electrofílica (iododesstanhação)



A purificação e caracterização dos compostos radioiodados foram efectuadas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão associada a um detector de UV e um detector de radiação γ . Os produtos foram obtidos com elevada radioactividade específica e pureza radioquímica superior a 95%. A caracterização química dos compostos radioiodados foi feita por comparação do seu comportamento cromatográfico com o do respectivo análogo não radioactivo.

O cortisol-3-(o-carboximetil)oxima-histamina- ^{125}I e a progesterona-11 α -hemissuccinato-TME- ^{125}I foram utilizados no doseamento radioimunológico do cortisol e da progesterona no soro humano, respectivamente [2]. A síntese dos isómeros (17 α ,20E)- e (17 α ,20Z)-3-metoxi- ^{125}I -iodovinil-6-desidroestradiol insere-se na linha de investigação em curso que visa o desenvolvimento de agentes de imagem para detecção de tumores mama ricos em receptores de estrogénio [3].

[1] - Rijks, L. J., Sokole, E. B., Stabin, M. G., de Bruin, K., Janssen, A. G. and van Royen, E. A. *Eur. J. Nucl. Med.* 25, 40-47, 1998.

[2] - P. Raposo, C. Oliveira, A. Rodrigues, I. Santos, L. Patrício (1991) Radioimmunoassay and Related Procedures: perspectives in Developing Countries, IAEA-SM-324/57, WHO International Symposium, Austria.

[3] - M. C. Melo e Silva, L. Patrício, L. Gano, M. L. Sá e Melo, E. Inohae, S. Mataka, T. Thiemann (1999). *Appl. Radiat. Isot.*, in press.

Detecção de Tributilo Estanho em Estuários Portugueses por CGC-FID

J.M.F. Nogueira

DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C1, 5º Piso, 1749-016 Lisboa, nogueira@fc.ul.pt

Os derivados orgânicos de estanho são considerados entre os compostos mais tóxicos alguma vez introduzidos deliberadamente nos ecossistemas naturais pelo Homem. Desta gama de compostos, destaca-se o tributiloestanho (TBT) que é usado sobretudo na composição das tintas antivegetativas, que impedem o desenvolvimento de incrustações em barcos, navios e docas.

As ostras são dos organismos marinhos mais estudados a nível internacional, em virtude de serem seriamente afectadas pela presença do TBT e correspondentes produtos de degradação.

Os estuários dos rios nacionais, são igualmente alvo deste tipo de problemas e os mais recentes trabalhos de investigação comprovam o efeito negativo dos organoestanosos sobretudo nas fêmeas das populações da espécie *Hinla reticulata*, nos estuários dos rios Tejo, Sado e Mira e em diversos pontos da costa sudoeste portuguesa, sendo causadores da quase extinção das populações da espécie *Crassostrea angulata Lmk.*

Nos países da União Europeia, o uso de TBT em tintas antivegetativas foi completamente banido durante a presente década e actualmente, a meta considerada de qualidade ambiental que minimiza os efeitos tóxicos nas diversas populações biotas, cifra-se em concentrações de TBT inferiores a alguns ppt's, apesar de persistirem no ambiente concentrações superiores.

Em Portugal, o decreto-lei n.º54/93 de 26 de Fevereiro, que estabelece diversas medidas relativas à limitação do uso, fabricação e comercialização de certas substâncias perigosas, como são o caso dos organoestanosos, foi introduzido com o objectivo de salvaguardar a saúde pública e o meio ambiente em geral.

No entanto, o recente decreto-lei n.º236/98 de 1 de Agosto, que determina normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático nacional, não especifica nenhum valor máximo admissível para o TBT, contrariamente a muitas instâncias internacionais, que actualmente o recomendam como inferior a 1ng/L.

Para as baixas concentrações no qual o TBT costuma ser detectado no meio ambiente, geralmente situadas na ordem das partes por bilião ou trilião ($\mu\text{g}/\text{L}$ ou ng/L), diversas metodologias analíticas são genericamente implementadas.

Os esquemas analíticos mais comuns para dosear o TBT, combinam três passos básicos, nomeadamente, pré-concentração do analito, que envolve a extração do TBT de matrizes líquidas ou sólidas, após ou com prévia de derivatização, em geral por alquilação com reagentes de Grignard, geração de hidretos ou formação de sais de cloreto; separação cromatográfica, usando colunas capilares de alta resolução com diversas fases estacionárias; e finalmente, detecção por fotometria de chama, captura electrónica e emissão atómica, assim como por emissão atómica de plasma induzida por microondas, espectrometria de absorção atómica de forno de quartzo, espectrometria de massa e espectrometria de massa acoplada a plasma induzido, como detecção "hifena".

Neste contexto, a presente contribuição, evidencia a análise de TBT em amostras aquosas e sedimentos com origem em diversas estações de amostragem dos estuários do Tejo e Sado, recorrendo-se à cromatografia gasosa capilar com detecção por ionização de chama (FID), após prévia preparação das amostras.

Verificou-se razoável linearidade nas gamas de concentração estudadas, tendo-se observado níveis de TBT da ordem dos ppt's em sedimentos do estuário do Tejo e ppb's em amostras aquosas do estuário do Sado.

Referências

- Ritsema R., (1997) Environmental Applications of Hyphenated Techniques for the Speciation of Tin, Arsenic and Mercury: Monitoring butyltin levels in marine environments of the Netherlands, Université de Pau et des Pays de l'Adour; Tese de Doutoramento.
- J.M.F. Nogueira, B. Simplício, M.H. Florêncio, A.M.M. Bettencourt (1999) Tributilo Estanho: Um Inimigo Ambiental, *Boletim da Soc. Port. Quím.*, 72 20-27.
- Environmental Oestrogen's: Consequences to Human Health and Wildlife, Assessment A1, MRC, Institute for Environment and Health, University of Leicester, Page Bros., U.K. 1995.
- Bettencourt A.M.M., Andrae M.O., Cai Y., Gomes M.L., Schebek L., Vilas Boas L.F., Rapsomanikis S., (1997) *The Tagus Estuary and Adjoining Coastlines*, Special Number of the Netherlands Journal of Aquatic Ecology, Proceeding of the ECSA Local Meeting.
- Nogueira J.M.F., Simplício B., Florêncio M.H., Bettencourt A.M.M., (1998) Analysis of Organotin Compounds in Tagus River by CGC and CGC-MS, Proceedings of 20th International Symposium on Capillary Chromatography, IOPMS, Riva del Garda, Italy.
- Decreto-lei n.º236/98 de 1 de Agosto, Diário da República, I SÉRIE-A, N.º 176 3676-3722.

Validação de um Método Cromatográfico para Análise do Pentobarbital Sódico em Supositórios

Paulo Costa, M. Rosa Pena Ferreira e M. Fernanda Bahia

Centro de Tecnologia do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

O pentobarbital sódico é um barbitúrico utilizado, por via rectal, como pré-anestésico em pediatria. O controlo dos supositórios inclui um conjunto de operações necessárias que permitem garantir o efeito farmacológico esperado, após adequada aplicação e dentro de um determinado período de tempo. O objectivo deste trabalho, foi validar um método analítico para a quantificação do pentobarbital sódico em ensaios de doseamento e de dissolução/libertação em supositórios moldados. A validação do método para a análise do pentobarbital sódico foi feita de acordo com o especificado nas ICH Harmonised Tripartite Guidelines. Procedeu-se ao estudo da exactidão, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), especificidade, linearidade e amplitude. Estudaram-se também outros parâmetros relacionados com o procedimento cromatográfico, tais como o factor de capacidade, o factor de simetria, etc. O método adoptado para o doseamento deste fármaco recorreu à cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa com a utilização de padrões externos.

A especificidade de um procedimento analítico pode ser definida como a capacidade de determinar um analito na presença de outras substâncias susceptíveis de estarem presentes na amostra. Os cromatogramas não apresentaram qualquer outro pico com tempos de retenção próximos, mesmo fazendo variar as proporções dos eluentes escolhidos. A exactidão expressa a proximidade entre um valor aceite como valor convencional ou um valor de referência e o valor encontrado. A exactidão média obtida foi de 1 O 1, 1 %. A precisão de um método é uma medida da proximidade dos valores em relação uns aos outros para um número de determinações nas mesmas condições analíticas. Este conceito engloba componentes: repetibilidade (precisão medida nas melhores condições possíveis), precisão intermédia (medida da precisão devida às variações provocadas dentro laboratório), e reproduzibilidade (medida da precisão determinada em estudos inter-laboratoriais). A repetibilidade deve ser assegurada

utilizando no mínimo 9 réplicas (3 réplicas em 3 diferentes concentrações) ou 6 determinações a 100 % da concentração esperada. A precisão de resposta do detector foi verificada injetando-se 3 réplicas de 5 diferentes concentrações. Para todas as concentrações o coeficiente de variação foi sempre inferior a 1%. A linearidade de um método pode ser definida como a capacidade de obter resultados directamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade deve ser verificada utilizando no mínimo 5 padrões em diferentes concentrações (preparados de modo independente) sendo o coeficiente de regressão linear (R) $\geq 0,999$. A linearidade foi verificada preparando-se soluções metanólicas do fármaco, em cinco concentrações sendo as soluções analisados em triplicado. Construiu-se um gráfico resposta do detector versus concentração e foram calculados o coeficiente de regressão linear (R), o coeficiente de determinação (R^2), a ordenada na origem (b), a inclinação da recta de regressão (m) e a soma dos quadrados dos resíduos (SQR). Através da equação da recta obtida pode determinar-se $m = 2,21 \times 10^{-4}$ e $b = -4,13 \times 10^{-4}$. Os valores de R , R^2 e SQR obtidos foram respectivamente de 0,9992, 0,9983 e 9,96 x 10⁻⁴. Esta linearização permitiu um bom ajuste entre o modelo teórico e os dados obtidos como pode ser visto pelo valores de R e R^2 . A amplitude

é geralmente derivada a partir dos estudos de linearidade e depende do objectivo do método analítico. No caso do doseamento de uma

substância activa de um lote de matéria-prima ou num produto farmacêutico acabado as gamas de amplitude mínimas devem estar compreendidas entre 80 e 120% da concentração esperada. No caso de ensaios de dissolução as gamas de amplitude mínimas devem ser cerca de +1-20% dos níveis das concentrações previstas. Deste modo, utilizou-se uma gama de concentrações alargada, espaçada de modo equilibrado, 25%, 42%, 68%, 80% e 112% do valor máximo esperado (0,06 mg/ml).

Para um bom comportamento cromatográfico o factor de retenção (k') deve estar compreendido entre 1 e 20. O pentobarbital nas condições cromatográficas escolhidas apresentou um t_r de 6,0 min, sendo assim o k' de 1,6. O número de pratos teóricos (N) deve estar deve em regra ser > 2000 . O valor de N obtido com este método foi superior a 4000. A simetria ou assimetria de um pico cromatográfico pode ser quantificada através do factor de simetria (f_s). Por vezes é necessário especificar um valor máximo permitido para a assimetria de um pico, sendo geralmente admitido como limite $f_s \leq 2$. Nas condições cromatográficas ensaiadas o factor de simetria variou entre 1,2 e 1,4.

Aplicação de GC-MS e HPLC ao Estudo de Extractos de Madeira de *EUCALYPTUS GLOBULUS*.

Tânia M. Silva, Sara M. Cravo, Fernando M. Domingues, José A. Cavaleiro
Departamento de Química - Universidade de Aveiro

No âmbito de um projecto que tem como objectivo estudar a evolução das características de madeira de eucalipto durante a armazenagem e o impacto no processo de produção de pasta e propriedades do produto final, foram estudados por GC-MS e HPLC os extractos de diversas amostras de madeira, com diferentes tempos de armazenagem.

Neste trabalho apresentam-se estudos de GC-MS dos extractos em éter etílico e estudos de HPLC dos extractos em metanol de uma madeira armazenada em estilha a uma temperatura de 40°C, humidade relativa de ≈43% e protegida da luz, por um período de 170 dias, durante o qual foram efectuadas diversas amostragens por forma a poder-se acompanhar a sua evolução.

Do estudo gravimétrico dos extractos obtidos por extração em Soxhlet com solventes de polaridade crescente, verifica-se que a quantidade de extractáveis em éter etílico, acetato de etilo e etanol diminui com o período de armazenamento.

Da análise por GC-MS dos extractos em éter etílico, foi possível obter uma caracterização completa, verificando-se que estes são muito ricos em α -sitosterol, β -sitostanol, álcoois e ácidos de cadeia longa. A quantificação por GC-MS permite-nos ainda visualizar variações não sistemáticas em algum componentes, com o tempo de armazenamento.

No estudo de HPLC, modo isocrático, obtiveram-se boas rectas de calibração para os ácidos gálico e elágico. Embora a quantificação não possa ser rigorosa, dadas as baixas percentagens de recuperação é aparente uma tendência para a diminuição dos conteúdos em ácido gálico e elágico com o envelhecimento. A quantificação destes é importante pois permite antever a formação de depósitos problemáticos (*pitch*) que ocorre durante o processo de produção de pastas [1]. O processo isocrático permite obter de uma forma mais rápida uma quantificação aproximada dos dois ácidos.

O estudo dos mesmos extractos por HPLC, modo gradiente, permite verificar a existência de vários outros compostos polifenólicos, nomeadamente elagitaninos e flavonóides.

[1] B. Charrier, M. Marques, J.P. Haluk, *Holzforschung*, 1992, 46, 87-89.

Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace White Wine Aroma Compounds

S. Rocha¹, V. Ramalheira¹, M. A. Coimbra¹, I. Delgadillo¹, A. Dias Cardoso²

¹ Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810 Portugal

² Estação Vitivinícola da Bairrada, Apartado 7, 3781 Anadia Codex, Portugal

Solid-phase microextraction (SPME) is a relatively new and simple adsorption technique for the isolation of headspace flavour compounds. These compounds are those that are perceived by the human nose and are related to the wine flavour quality.

SPME headspace sampling requires neither solvent extraction or purification steps nor a complicated purge-and-trap apparatus. The application of this technique to wine flavour analysis will improve the reproducibility, sensitivity, and resolution of the gas chromatograms, allowing a more accurate quantification of these compounds.

However, SPME analysis is quite sensitive to experimental conditions such as sampling temperature, time, volume, concentration and matrix uniformity, parameters not yet defined for the white wine analysis.

In the present study, it was examined a headspace SPME sampling in a test solution comprising 9 wine flavour components that are present in white wines: 3- methyl-*l*-butanol, hexanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, linalool, geraniol, nerol and 2-phenylethanol in a 10% ethanol solution. The experimental conditions studied were: sample volume (20-40 mL), quantity of NaCl added (0-16 g), equilibrium time (15-45 minutes), temperature (25-40°C) and stirring (stirring/no stirring). The pH, the ethanol content and the volume of the sampling glass vial were kept constant: 3.3, 10% and 120 mL, respectively. The headspace aroma compounds of this matrix were isolated by a fibre coated with 85 μ m of polyacrylate and separated by gas chromatography.

The best reproducibility and sensitivity were obtained for the following conditions: 40mL of sample with 8 g of NaCl, allowing an equilibrium of the aroma compounds between the SPME coating and the matrix of 45 minutes at 25°C with stirring. As the adsorption response of the fibre is not similar for all compounds, for quantitative analysis, an individual response factor is proposed for the conditions under operation.

Sais Solúveis e Deterioração de Azulejos Antigos

J. Costa Pessoa^a, C. Borges^a, M.O. Figueiredo^b e M. Malhoa Gomes^c

^a Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa.

^b Centro de Cristalografia e Mineralogia, Al. Afonso Henriques, 41-4ºE, 1100 Lisboa.

^c Direcção Geral de Edifícios e Monumentos Nacionais, Av. Infante Santo 69-1º, 1300 Lisboa

A deterioração de pedras, monumentos e de diversos tipos de obras de arte devido à presença de sais solúveis é um fenómeno bem conhecido¹. O caso dos azulejos tem a particularidade de, como este é vidrado e esta é a parte que está visível, quando a presença de sais é detectada já a deterioração está num estádio bastante avançado.

A água circula através das paredes onde os azulejos estão aplicados ou das argamassas de assentamento e provém ou de ascensão capilar a partir do solo, ou de infiltrações nos telhados dos edifícios. Os sais solúveis em água são introduzidos no corpo cerâmico e no vidrado dos azulejos e, ou vêm já com a água infiltrada, ou resultam da lexituição dos materiais do edifício com que a água contacta.

Um dos primeiros passos no restauro de azulejos é a remoção dos azulejos das paredes. Em seguida os sais têm de ser extraídos dos azulejos, ou seja, tem de se fazer a dessalinização dos azulejos. Para isso podem ser usados diversos tipos de procedimentos que foram testados no presente trabalho. Para monitorizar estes processos, identificar e quantificar as espécies removidas utilizou-se cromatografia iônica, condutimetria e um analisador de carbono inorgânico e orgânico.

Os principais anões extraídos são Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e carbonato mas o oxalato, fosfato e nitrito foram ocasionalmente também analisados. Os principais catiões são Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . A cinética de remoção varia dependendo do tipo de iões.

Fez-se também a quantificação de iões presentes em diversos tipos de argamassas retiradas de diversos locais da Igreja de S. Salvador em Coimbra. O tipo e quantidade de espécies presentes são as mesmas dos azulejos aplicados nesses locais. Os azulejos provenientes desta igreja contêm uma enorme quantidade de sais, sendo as quantidades de Cl^- , NO_3^- e carbono orgânico particularmente elevadas. Pensa-se que a presença destas espécies nas paredes e azulejos resultou da presença de pombos durante anos e infiltração de águas através dos telhados em mau estado.

Referências

1. A. Goudie e H. Viles, *Salt Weathering Hazards*, Wiley, Chichester, 1997

A Cromatografia no Estudo de Aromas em Enologia

Maria Cristina Clímaco, Madalena Miguel.

Estação Vitivinícola Nacional INIA.2565-191 Dois Portos. Portugal.

E-mail: inia.evn@mail.telepac.pt

Introdução

Os estudos de aromas em enologia são complexos e possuem alguma especificidade. Efectivamente, os produtos alimentares envolvidos (uvas, mostos, vinhos e aguardentes) caracterizam-se por ter uma matriz extremamente complexa, necessitando os constituintes do aroma de ser extraídos, concentrados, separados, identificados e quantificados. Se acrescentarmos, que se trata de constituintes com uma gama muito variada de teores e de funções químicas [1,2] e que se tem de avaliar a sua qualidade aromática, o seu limiar de percepção olfactiva, a sua importância relativa no aroma final do produto e estabelecer as respectivas correlações, pode-se perceber um pouco da complexidade destes estudos. No entanto, a utilização de diversas técnicas cromatográficas tornou possível o conhecimento cada vez mais aprofundado de toda esta problemática.

A cromatografia na concentração e separação de constituintes do aroma

De acordo com o produto em estudo e os objectivos pretendidos, pode-se recorrer a diversas técnicas de extração/concentração dos constituintes do aroma. Quando se pretende estudar a fracção volátil, a técnica mais utilizada é a extração líquido-líquido, com posterior concentração do solvente.

Nos casos em que se pretende estudar substâncias precursoras do aroma, geralmente sob a forma glicoconjungada e difíceis de isolar e separar, recorre-se a técnicas de retenção selectiva em Amberlite XAD-2 [3] ou em RP-C18 [4,5] e posterior concentração dos eluídos. No caso dos derivados dos carotenoides, nomeadamente dos norisoprenoides em C13 voláteis, após o isolamento da fracção glicosídica (adsorção em RP-C18) procede-se ao fraccionamento por DCCC-droplet countercurrent chromatography [6,7]. Outra técnica que se pode utilizar é MLCCC-multi-layer coil countercurrent chromatography [8], que sendo uma técnica de cromatografia líquido-líquido, torna-se apropriada para a separação preparativa de produtos naturais lábeis.

A cromatografia na identificação e na quantificação de aromas

Os estudos de aromas em enologia sempre acompanharam o desenvolvimento das técnicas de cromatografia em fase gasosa. Actualmente a identificação e a quantificação, quer da fracção livre, quer da fracção glicoconjungada realizam-se por CGAR e/ou CG-EM. Os avanços realizados na análise da fracção conjugada nos últimos anos levaram brevemente à utilização de técnicas de CL-EM.

A cromatografia na determinação da qualidade e importância relativa do aroma

Na determinação da qualidade e da importância relativa de substâncias voláteis no aroma final do produto existem hoje métodos que permitem efectuar medições quantitativas das sensações odoríferas relacionando-as com a identidade química dos compostos que produzem esses odores. Desses métodos deve salientar-se a AEDA -*Aroma Extraction Dilution Analysis* [9] e a *Charm Analysis*TM [10]. Ambas estas técnicas produzem “cromatogramas” de registos de análise sensorial olfactiva dos componentes eluídos numa coluna de CGAR, em diluições sequenciais.

Conclusões

Os progressos actuais na química dos aromas aplicados aos produtos da fieira enológica mostram que em todas as fases destes estudos estão presentes diversas técnicas cromatográficas e que o seu acoplamento à análise sensorial olfactiva e a um sistema de recolha e tratamento de informação, permite avaliar objectivamente os dados olfactivos e efectuar correlações entre as análises química e sensorial.

Referências bibliográficas

1. Schreier P., (1979) *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, 12; 59-111.
2. Etievant P.X., Issanchou S.N., (1987) *La Recherche* 193: 1344-1353.
3. Gunata Y.Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R., (1985) *J. Chromat.*, 331; 83-90.
4. Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. Massy-Westrop R.A., (1991) *J. Chromat.*, 235; 471-480.1982.
5. Di Stefano R., (1991) *Bull. OIV*, 721-722; 219-223.
6. Strauss C.R., Gooley P.R., Wilson B., William P.J., (1987) *J. Agric. Food Chem.*, 35; 519-524.
7. Winterhalter P., Sefton M.A., Williams P.J., (1990) *J. Agric. Food Chem.*, 38; 1041-1048.
8. Winterhalter P., (1993) In: *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*. Ed. Revue Française d’Oenologie. Montpellier. p. 65-73.
9. Ullrich F., Grosch W., (1987) *Z. Lebensm. Unters Forch*, 184; 277-282.
10. Acree T.E., Cotrell T.H.E. (1985) In: *Alcoholic beverages*. Elsevier Applied Science Publishers. p. 145-159.

Comunicações em Painéis

CROMATOGRAFIA GASOSA

P1. Micro-Geração de Metano para Determinação do Tempo Morto em Cromatografia Gasosa Capilar

J.M.F. Nogueira

DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C1, 5º Piso, 1749-016 Lisboa, nogueira@fc.ul.pt

A velocidade linear média, u (cm/s) de um gás de arrastamento em cromatografia gasosa capilar é vulgarmente estimada na tentativa de se trabalhar na máxima eficiência.

Genericamente, utiliza-se um composto que não apresente retenção e responda simultaneamente ao detector utilizado, que no caso da ionização de chama, condutividade térmica e espectrometria de massa é geralmente metano. No entanto, outros métodos mais sofisticados podem ser utilizados apesar de serem menos práticos.

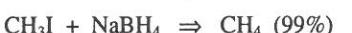
Se atendermos à equação de Golay, $H=B/u + C_S.u + C_M.u$, onde H (mm) é a altura equivalente a um prato teórico, a velocidade linear óptima $u_{opt} = (B/C_S+C_M)^{1/2}$, pode ser facilmente estimada através da razão entre o comprimento da coluna usada, L (cm) e o tempo morto, t_M (s), $u=L/t_M$, por ajustamento da pressão à cabeça do injector.

Para as colunas capilares mais utilizadas ($10\text{-}60\text{m} \times 0,25\text{-}0,32\text{mm d.i.} \times 0,1\text{-}0,5\mu\text{m}$ espessura de filme), as velocidades lineares médias geralmente adoptadas para os gases de arrastamento são da ordem de $10\text{-}15\text{cm/s}$, $25\text{-}30\text{cm/s}$ e $35\text{-}45\text{cm/s}$ para o azoto, hélio e hidrogénio, respectivamente.

Uma das limitações que por vezes surge na determinação de u , prende-se com a inexistência de metano nos laboratórios, para além das garrafas comerciais serem dispendiosas. Por este motivo, muitos analistas recorrem ao uso de outros compostos, nomeadamente solventes de cadeia curta, para estimar a velocidade linear média. No entanto, o metano é sempre mais desejável face a outros compostos, uma vez exibir um tempo de retenção desprezível e assim, contribuir para parâmetros cromatográficos mais correctos.

Uma forma simples de produzir metano (CH_4), consiste na redução de iodometano (CH_3I) com tetrahidreto borato de sódio (NaBH_4) em meio de éter dietileno-glicol-metílico (diglime):

Diglime



onde um bom rendimento de metano é sempre obtido (99%).

Se pequenas porções de metano forem produzidas no laboratório, sem grandes riscos uma vez ser um gás explosivo, inflamável e tóxico, este procedimento parece ser convenientemente simples e prático para calcular com eficácia o tempo morto em cromatografia gasosa capilar, fundamentalmente se são usados detectores adequados.

A presente contribuição tem como objectivo a abordagem a um método fácil, rápido e seguro de gerar metano à escala micro, no sentido da determinação do tempo morto em cromatografia gasosa capilar, para estimar a velocidade linear média.

Referências

- Hinshaw, J.V.; Ettre, L.S. Introduction to Open-Tubular Column Gas Chromatography, Advanstar Com., Ohio, 1994; Chapter II.
- Jennings, W. Analytical Gas Chromatography, Academic Press, London, 1987, Chapter 5.
- Barton, D.; Ollis, W.D. Comprehensive Organic Chemistry, Pergamon Press Ltd.; U.K.; 1979; Vol.1, 535.
- Castello, G.; Vezzani, S.; Moretti, P. J. Chromatogr., 1994, 677, 95-106.
- Vezzani, S.; Castello, G.; Moretti Proceedings of 16th International Symposium on Capillary Chromatography, IOPMS, Riva del Garda, Italy, 1994, 103-107.

P2. Determinação dos Teores de Etanal, Acetato de Etilo, Metanol, 2-Butanol, 1-Propanol, 2-Metil-1-Propanol, 2-Propeno-1-ol, 1-Butanol, 2-Metil-1-Butanol+3-Metil-1-Butanol em Aguardentes Vínicas por CG

Ilda Caldeira; Carla Lopes; Maria Cristina Clímaco

1)Estação Vitivinícola Nacional. INIA. 2565-191 Dois Portos. Portugal.

E-mail:inia.evn@mail.telepac.pt

INTRODUÇÃO

O controlo de qualidade de aguardentes vínicas implica o controlo do teor de um conjunto de compostos, cuja análise se realiza por cromatografia em fase gasosa de acordo com a NP 3263 [1]. Neste trabalho é apresentada a optimização das condições de análise do método proposto na norma NP 3263 [1], utilizando uma coluna capilar DB-225.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras – solução padrão constituída por etanal, acetato de etilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-propeno-1-ol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol+3-metil-1-butanol, 4-metil-2-pentanol (padrão interno) em solução alcoólica a 50%.

Análise cromatográfica – cromatógrafo (Shimadzu-GC-17A) com detector de ionização de chama (250°C), coluna capilar (DB-225-30mx0.25mmx0.25μm) e injector (250°C) com repartidor de fluxo. A eluição foi realizada com hidrogénio em gradiente de temperatura

Optimização do gradiente de temperatura utilizado - ensaiaram-se vários gradientes de temperatura para a separação dos compostos da solução padrão, nomeadamente 35°C-4min, 10°C/min até 200°C, 200°C-1min; 35°C-12min, 11°C/min até 200°C, 200°C-1min; 35°C-6min, 10°C/min até 75°C, 75°C-3min, 10°C/min até 200°C-1min; 35°C-6min, 10°C/min até 69°C, 69°C-3min, 10°C/min até 200°C-1min.

Optimização do fluxo de gás vector - ensaiaram-se vários fluxos para o gás de arraste nomeadamente 1.4ml/min, 1.2ml/min, 1.0ml/min e 0.9 ml/min.

Estudo da repetibilidade da injeção: calculou-se a repetibilidade realizando 10 injeções de dois destilados de aguardentes vínicas envelhecidas (aguardente 1 e aguardente 2), obtidos de acordo com a norma NP 3263 [1]. Para cálculo da repetibilidade seguiu-se a metodologia proposta por Olschimke [2]

RESULTADOS

Optimização das condições de separação cromatográfica - As condições de melhor separação cromatográfica, para os compostos em estudo, foram: fluxo de gás vector de 0.9ml/min e gradiente de temperatura de: 35°C-6min, 10°C/min até 69°C, 69°C-3min, 10°C/min até 200°C-1min, apresentando-se na fig. 1 o cromatograma de uma solução padrão nas condições optimizadas.

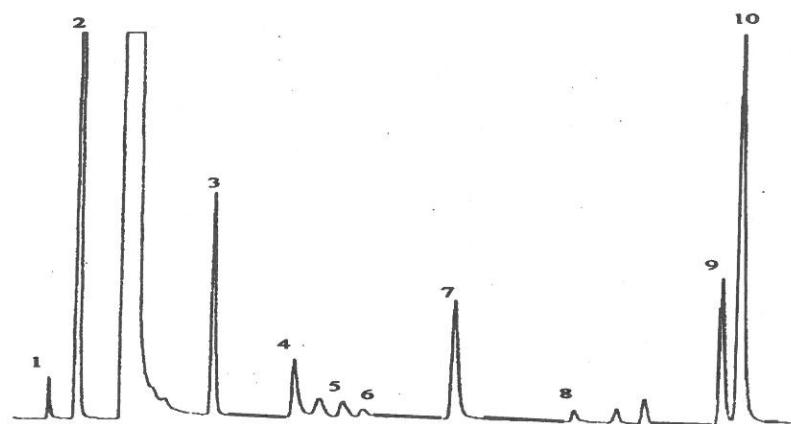


Figura 1 - Cromatograma de uma solução padrão (1- etanal, 2-metanol, 3-acetato de etilo, 4-1-propanol, 5-2-butanol, 6- 2-propeno-1-ol, 7-2-metil-1-propanol, 8-1-butanol, 9-4-metil-2-pentanol (padrão interno), 10- 2-metil-1-butanol3-metil-1-butanol.)

Repetibilidade - procedeu-se ao cálculo da repetibilidade conforme se descreveu na parte experimental. Os valores encontrados são apresentados na tabela 1

Tabela 1.

Composto	Aguardente 1		Aguardente 2	
	valor medio (mg/l de etanol)	repetibilidade (mg/l de etanol)	valor medio (mg/l de etanol)	repetibilidade (mg/l de etanol)
Etanal	44.83	7.91	47.75	6.70
Metanol	131.68	6.85	129.58	3.67
Acetato de etilo	94.64	11.02	101.97	8.48
1-propanol	39.16	1.66	39.21	1.39
2-butanol	7.80	1.34	7.55	1.33
2-metil-1-propanol	65.18	3.36	63.67	2.72
1-Butanol	1.65	2.10	1.61	2.16
3-metil-1-butanol+2-metil-1-butanol	268.67	17.77	264.86	13.42

Referências bibliográficas

- 1-CT83 (1990) -NP-3263. Instituto Português da Qualidade
2-Olschimke D. (1979) *Feuillet vert* nº 682. OIV

P3. Estudo da Fracção Livre do Aroma de Vinhos Brancos Elementares das Castas Loureiro, Alvarinho e Albariño

Virgílio Falco, M. Beatriz Oliveira, Margarida A. Ferreira
Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
Rua Aníbal Cunha 164, 4050 Porto

INTRODUÇÃO

A composição aromática do vinho é afectada pela fermentação e pela composição das uvas, sendo de destacar o factor casta. Tradicionalmente, o aroma tem sido um dos factores que mais significativamente contribui para a avaliação da qualidade de um vinho e revela-se de extrema importância na sua tipificação. O aroma do vinho é de grande complexidade devido ao elevado número de compostos que o constituem (várias centenas de compostos), que pertencem a diversas classes de compostos químicos: ésteres, alcoóis, ácidos, aldeídos e cetonas, terpenos, lactonas, etc. No presente trabalho foi o estudiada a fracção livre do aroma de vinhos elementares das castas Loureiro, Alvarinho e Albariño numa tentativa de conseguir a discriminação dos três tipos de vinho assente no diagrama dos componentes desta fracção.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Vinhos elementares das castas Loureiro (4 amostras), Alvarinho (4 amostras) e Albariño (3 amostras) adquiridos no comércio.

Extracção: A extracção da fracção livre do aroma foi efectuada de acordo com o método proposto por Cocito *et al.* (1995). Uma alíquota de 50 mL de amostra foi extraída sucessivamente por 15, 5 e 5 mL de diclorometano durante 10 minutos num banho de ultra-sons a 20°C. O extracto final, resultante da mistura dos três ciclos de extracção, foi desidratado com sulfato de sódio e concentrado num evaporador rotativo a 42°C, sem vácuo, até um volume final de cerca de 0,2 mL.

Equipamento e condições de análise cromatográfica: A análise do extracto foi efectuada num cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP6890. A coluna utilizada foi uma coluna capilar DB-Wax da J&W (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). As condições de trabalho foram as seguintes: gás de arraste, hélio ao fluxo de 1 ml/min; temperatura do injector (de divisão) e do detector (DIC), 250°C; programa de temperaturas, 5 min a 50°C, seguido de 4°C/min até 210°C e por fim 30 min a 210°C; volume injectado, aproximadamente 1 µL; razão de divisão, 30:1.

RESULTADOS

Foram detectados diversos compostos (figura 1): acetato de isobutilo (1), butirato de etilo (2), 1-propanol (3), 2-metil-1-propanol (4), acetato de isoamilo (5), 1-butanol (6), 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol (7), hexanoato de etilo (8), piruvato de etilo (9), acetato de hexilo (10), lactato de etilo (11), 1-hexanol (12), *trans*-3-hexenol (13), *cis*-3-hexenol (14), octanoato de etilo (15), benzaldeído (16), 2,3-butanediol (17 e 19), linalol (18), decanoato de etilo (20), succinato de dietilo (21), α -terpineol (22), acetato de 2-feniletilo (23), ácido hexanóico (24), álcool benzílico (25), 2-feniletanol (26), ácido octanóico (27), ácido decanóico (28). Efectuou-se a quantificação destes compostos e a comparação dos perfis aromáticos dos vinhos elementares das 3 castas.

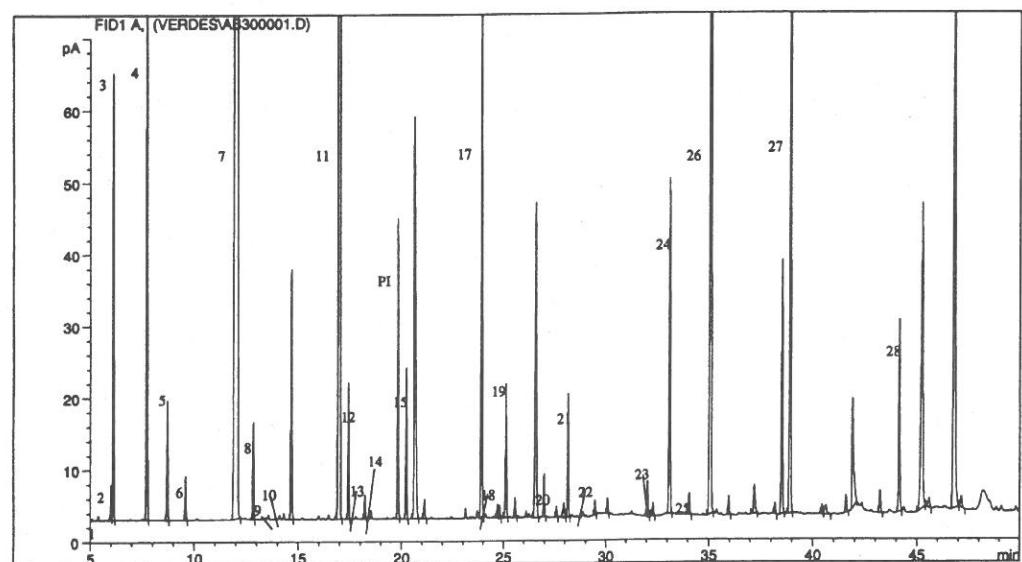


Figura 1. Cromatograma resultante da análise do extracto de um vinho elementar da casta Albariño.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Cocito C, Gaetano G, Delfini C, 1995. Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry* 52: 311-320.

P4. Estudo de um Método de Doseamento de Constituintes Voláteis em Vinagres de Vinho*

Madalena Miguel, Pedro Ribeiro-Corrêa e Maria Cristina Clímaco

Estação Vitivinícola Nacional. INIA. 2565-191 Dois Portos. Portugal.

E-mail: inia.evn@mail.telepac.pt

Introdução

Na indústria dos vinagres, o aroma assume uma importância crescente, tornando-se urgente a optimização de um método que permita realizar a sua análise. Nos trabalhos efectuados sobre este tema notam-se duas tendências, uma que defende a necessidade de neutralizar a amostra com óxido de magnésio antes da sua análise, para diminuir a quantidade de ácido acético [1], outra que afirma que a neutralização altera a composição da amostra [2]. Este trabalho pretende contribuir para a indústria dos vinagres através da optimização de um método que permita extrair, separar, identificar e dosear os constituintes voláteis de vinagres de vinho.

Análise cromatográfica

Foi realizada num cromatógrafo de fase gasosa Vega 6000, com injector de splitter a 250°C, detector de ionização de chama a 250 °C, e coluna DB-Wax de 30 m de comprimento, 0.32 mm de diâmetro interno e 0.25 μ m de espessura de filme com um programa de temperaturas de 5 min. a 35 °C, rampa de 2,5 °C/min até 210 °C e 10 min. a 210 °C. O gás transportador foi o H₂ com um fluxo de 1.5 mL/min.

Extracção de constituintes voláteis

Efectuou-se preliminarmente um ensaio com e sem neutralização prévia da amostra com óxido de magnésio sólido. Assim, fizeram-se 3 extrações do mesmo vinagre: uma sem qualquer tratamento prévio da amostra, outra com neutralização da amostra a pH 7 e outra com neutralização da amostra a pH 4. A extração líquido-líquido realizou-se por ultrassonificação, utilizando como solvente diclorometano bi-distilado [3,4].

Dos resultados obtidos, concluiu-se que as duas neutralizações efectuadas provocaram grandes alterações na composição química da amostra, já que os extractos obtidos não eram representativos do aroma global da amostra. Deste modo optou-se por não se efectuar qualquer tratamento à amostra, utilizando-se posteriormente, durante a análise cromatográfica, um programa de temperaturas mais lento para conseguir separar os compostos com tempos de retenção próximos do do ácido acético.

Estudo do padrão interno

Verificou-se que o 2-octanol, utilizado para vinhos, originava um pico mal separado, por eluir muito próximo do ácido acético. Das outras substâncias ensaiadas: 4-nonanol, nonanoato de metilo, 1-decanol, 1-undecanol, 4-metil-2-pentanol e 3,4-dimetil-fenol, apenas as duas últimas originaram picos bem separados, e como

eluíam em zonas bem distintas do cromatograma, optou-se por utilizar as duas: o 4-metil-2-pentanol para compostos anteriores ao ácido acético e o 3,4-dimetil-fenol, para os restantes.

Repetibilidade do método

Para o estudo da repetibilidade do método, realizaram-se 7 extracções do mesmo vinagre, e injectou-se cada extracto em triplicado, nas condições cromatográficas acima descritas. Os constituintes foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção de substâncias puras injectadas nas mesmas condições cromatográficas, por injecção de extractos e de substâncias puras numa coluna de polaridade diferente (DB-225) e por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. A quantificação foi efectuada em áreas relativas de 4-metil-2-pentanol e de 3,4-dimetil-fenol. A partir destes resultados calculou-se a área média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada um dos 30 picos isolados. Concluiu-se assim, que o método apresenta uma boa repetibilidade em relação a qualquer um dos padrões internos usados, já que os valores do coeficiente de variação são, na quase totalidade dos casos, inferiores a 10%.

Conclusões

Este método parece ser adequado ao doseamento de constituintes voláteis de vinagres de vinho, uma vez que permitiu a separação de cerca 30 compostos, é rápido e simples, não provoca alterações na composição química das amostras e tem boa repetibilidade.

Referências Bibliográficas

- 1 - Kahn H.J., Nickol B.G., Conner A.H., (1972). *J. Agric. Food Chem.* 20:214-217.
- 2 - Blanch P.G., Tabera J., Sanz J., Herraiz M., Reglero G., (1992). *J. Agric. Food Chem.* 40:1046-1049.
- 3 - Cocito C., Gaetano G., Delfini C., (1995). *Food Chemistry* 52:311-320
- 4 - Ribeiro-Corrêa P., (1996). *Influência de tecnologias de acabamento no aroma de vinhos brancos*. Tese de Mestrado em Viticultura & Enologia. ISA. UTL. Lisboa.

P5. A Fermentação Malo-Láctica nos Vinhos *versus* Composição Química

Angela M.S.Relva¹, Ana M.Costa¹ e Zilda Braga de Moraes²

¹ CQFB do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
2825-114 Caparica Portugal

² Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul Quinta da Granja, 2528 –114 Caparica

A indústria do vinho, tenta cada vez mais aprofundar o conhecimento de todos os factores responsáveis pela qualidade do produto final. A fermentação malo-láctica (FML) tem sido objecto de vários estudos, no sentido de verificar a sua influência nas propriedades organoléticas de vinhos jovens. Tem sido publicada muita informação à cerca da produção de compostos activos, durante a FML, responsáveis pelo aroma dos vinhos, sem que se tenha, contudo, estabelecido uma relação entre a contribuição individual dos compostos no efeito sensorial. O objectivo deste trabalho é determinar a influência da fermentação malo-láctica na composição química dos constituintes voláteis de vinhos portugueses.

Foram estudados quatro vinhos diferentes, para dois deles foram-nos fornecidas amostras antes e após a FML tendo os outros dois a FML terminada. Todas as amostras foram previamente analisadas por HPLC quanto ao teor em ácidos málico e láctico. Apesar da informação fornecida quanto à FML, pode observar-se Tabela 1, que os dados obtidos por HPLC para as concentrações de ácido málico e láctico não são concordantes. Foi valorizada neste estudo a diminuição na concentração de ácido málico como indicativo da FML, uma vez que o ácido málico pode ser produzido por outras vias.

TABELA 1 Valores encontrados para a concentração dos ácidos málico e láctico nos vinhos estudados

Vinhos	Informação do fornecedor sobre a FML		Ác. málico mol dm ⁻³	Ác. Láctico mol dm ⁻³
	Sim	Não		
Açougue (1)*	X		1,04 x10 ⁻²	7,75 x 10 ⁻²
Açougue (2)*		X	4,38 x10 ⁻³	3,23 x10 ⁻²
Açougue (3)		X	2,80 x10 ⁻³	1,34 x10 ⁻²
Açougue (4)*	X		1,82 x10 ⁻³	2,22 x10 ⁻¹
Açougue (5)	X		1,26 x10 ⁻²	2,95 x10 ⁻²
Sinete	X		3,16 x10 ⁻³	1,76 x10 ⁻²
Piriquita		X	1,32 x10 ⁻²	5,9 x10 ⁻²

* Refere-se a vinhos brancos; os restantes são tintos

Para análise dos componentes voláteis utilizou-se um método de extracção e destilação simultâneos (SDE) seguido de GC e GC-MS. A figura 1 mostra os cromatogramas de corrente iónica total obtidos para uma amostra de vinho (açougue 3 e 5) tabela 1 antes e após a fermentação malo-láctica. Embora considerando estes resultados preliminares, é possível verificar diferenças, não apenas na concentração, mas ainda na composição das amostras.

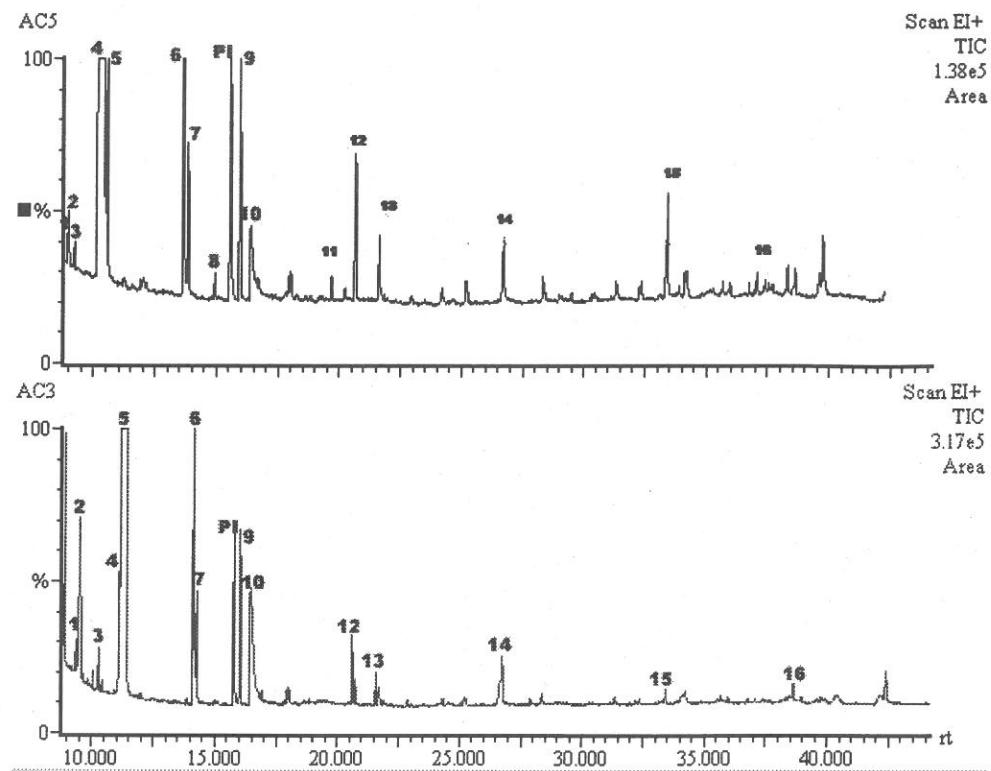


Figura 1: Cromatogramas dos vinhos acougue 3 e acougue 5 respectivamente sem e com FML. Condições 50°C 3°C/min a 210°C . Gás de arraste He a 100kPa. Injecção em splitless 1 min. Fonte iónica a 200°C; interface 250°C. EI 70 eV.

TABELA 2 Identificação dos picos dos cromatogramas da figura 1

Peak Nr	Identificação	Peak Nr	Identificação	Peak Nr.	Identificação
1	Acetato de isoamilo	6	Lactato de etilo	11	Lactato de isoamilo
2	2-butanol	7	Hexanol	12	Caprato de etilo
3	Acetato de hexilo	8	3-etoxy-propanol-1-acetato	13	Succinato de dietilo
4	2-pentanol	9	Caprilato de etilo	14	2-feniletanol
5	Capronato de etilo	10	Ac. acético	15	Monoetilsuccinato

P6. Determinação de Enantiómeros de Aminoácidos em Alimentos na Forma de Ésteres N(O,S)-toxicarbonil heptafluorobutílicos

Susana Casal, J. O. Fernandes, M. Beatriz Oliveira e Margarida A. Ferreira
CEQUP / Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal email: bromato@ff.up.pt

Introdução

Para a análise dos enantiómeros dos aminoácidos por cromatografia gasosa (GC) estão descritos variados processos de derivatização e o recurso a colunas quirais (Chirasil-Val, Lipodex E, etc.). Estes processos de derivatização são, normalmente, laboriosos e envolvem normalmente aquecimentos intensos (60-150°C) durante tempos prolongados. Com o objectivo de conseguir um processo mais rápido, com derivatização à temperatura ambiente, testamos várias combinações de álcoois e cloroformatos com vista à formação de ésteres N-alcoxcarbonilalquilaicos.

Materiais e métodos

Reagentes: Prepararam-se soluções equimolares dos aminoácidos D e L a 4µmol/mL em HCl 0,1M. Como cloroformatos testaram-se os cloroformatos de etilo e de isobutilo e como álcoois o etanol, o isobutanol e o heptafluorobutanol.

Derivatização: Os derivados com melhor coeficiente de resposta e resolução foram os ésteres N(O,S)-etoxicarbonil heptafluorobutílicos, para os quais se estabeleceu as condições de derivatização¹. A uma solução aquosa de aminoácidos (100 µL) é adicionado 30 µL de heptafluorobutanol/piridina (2:1) e 7 µL de cloroformato de etilo. Após uma agitação de cerca de 10 segundos em vortex, os derivados são extraídos com 100 µL de clorofórmio, sendo esta solução directamente injectada no cromatógrafo.

Cromatografia gasosa: A cromatografia gasosa foi realizada num cromatógrafo Chrompack (CP-9001). A coluna utilizada foi uma Chirasil-L-Val (25 m x 0,25 mm). As condições de trabalho foram as seguintes: gás de arraste, hélio; temperatura do injector, 250 °C; temperatura do detector de ionização em chama, 280 °C; forno com um programa de temperatura desenvolvido para o efeito.

Resultados e discussão

O processo de derivatização desenvolvido foi aplicado à determinação do perfil de aminoácidos livres de vários alimentos, seguindo a metodologia clássica de precipitação proteica seguida de limpeza iônica selectiva em colunas de fase sólida. Como padrão interno utilizou-se a *p*-clorofenilalanina. A Tabela 1 apresenta os resultados.

Tabela 1: Perfil de aminoácidos livres de vários alimentos

Aminoácido	Leite UHT		Leite fermentado		Iogurte		Cerveja preta		Vinagre balsâmico	
	D %	L (mg/100mL)	D %	L (mg/100mL)	D %	L (mg/100mL)	D %	L (mg/100mL)	D %	L (mg/100mL)
Alanina	3,4	0,28	45,9	3,37	60,2	0,41	NC	1,51	28,3	3,70
Glicina		0,18		0,99		0,56		0,81		1,82
Valina	-	0,29	5,0	0,76	2,9	0,33	9,5	0,19	-	3,35
Prolina	#	0,36	#	5,02	#	1,61	#	30,17	#	33,70
Isoleucina	-	0,16	2,7	0,72	20,0	0,12	5,3	0,18	-	2,83
Leucina	17,4	0,19	9,6	0,85	12,1	0,29	-	0,38	5,2	6,98
Ác. Aspártico*	-	0,49	43,9	0,87	9,6	6,77	20,9	1,40	-	3,12
Ác. glutâmico*	-	4,67	10,0	1,08	44,6	0,41	18,3	0,94	37,7	1,24
Metionina	-	0,36	-	0,10	-	0,08	8,3	0,11	16,1	0,52
Fenilalanina	-	0,08	0,9	1,09	15,8	0,32	10,8	0,33	1,1	11,38
Histidina	-	0,03	26,8	0,60	7,7	0,36	12,0	0,22	1,8	4,98
Lisina	-	1,46	36,3	2,04	29,3	1,81	-	0,69	28,8	4,38
Tirosina	-	0,25	-	0,04	11,1	0,08	-	0,26	-	4,56
Triptofano	-	-	-	0,07	-	0,05	12,9	0,54	-	-
AA totais (mg/100 mL)	8.85		22.80		16.04		38.50		85.42	

NC = não calculado devido a separação incompleta de um pico interferente; # os enantiómeros da prolina não separam;

* O ácido aspártico inclui a asparagina e o ácido glutâmico inclui a glutamina; - = abaixo do limite de detecção

Conclusões

A análise quiral de AA, embora não seja ainda um procedimento de rotina em química alimentar, poderá complementar, outros métodos de controlo higio-sanitário e de autenticidade dos produtos alimentares. Este processo rápido de derivatização poderá constituir uma alternativa vantajosa a outros processos descritos na literatura.

Agradecimentos

S. Casal agradece o apoio financeiro concedido pelo Sub-Programa Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de apoio (BD/9580/96)

Bibliografia: ¹ S. Casal, J. O. Fernandes, M. B. Oliveira and M. A. Ferreira, *Amino Acids*, 17, 62, 1999.

P7. Micro-extracção em Fase Sólida para Análise de Compostos Voláteis Característicos de Produtos de Panificação

S. Castro, I. Delgadillo e J.A. Lopes da Silva

Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro – Portugal

A micro-extracção em fase sólida (SPME) é uma técnica recente, apresentando como vantagens o facto de ser rápida, livre de solventes, barata, e capaz de integrar a amostragem, a extracção, a concentração e a introdução de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis num único passo (1,2). Esta técnica consiste na introdução de uma fibra de sílica fundida, com um revestimento polimérico específico, no espaço de cabeça, e na desorção no sistema analítico, por exemplo, num cromatógrafo de gases (3). Desde o início da sua utilização, o âmbito das aplicações estendeu-se à análise de amostras forenses, farmacêuticas e alimentares (4,5).

Neste trabalho utilizou-se a técnica de SPME na extracção e análise de compostos voláteis representativos do aroma associado a produtos de panificação, estudando-se alguns dos factores que terão influência significativa neste processo. Entre a grande variedade de compostos voláteis que caracterizam quer o aroma das farinhas de trigo não processadas, quer o aroma característico dos produtos de panificação, após cozedura (6,7), apenas se seleccionaram os seguintes: hexanal, nonanal, decanal, *trans*-2-nonenal, 2-acetylpiridina, (E,E)-2,4-decadienal, e 2-feniletanol.

O sistema de análise consistiu na extracção dos compostos voláteis no espaço de cabeça, através de SPME, seguida de introdução na câmara de injecção do cromatógrafo de gases (GC) e detecção por ionização de chama (FID). A fibra utilizada foi de 85 µm de poliacrilato (PAC), com um tempo de extracção de 15 min. As condições utilizadas foram: $T_i=35^{\circ}\text{C}$, rampa a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $T_f=135^{\circ}\text{C}$, 10 min.; temperaturas de detector e injector 255°C e 250°C , respectivamente. As amostras foram analisadas segundo vários parâmetros: Temperatura (20°C , 37°C e 50°C), tempo de equilíbrio (30, 45 e 60 min.), força iônica (NaCl 0,5 e 1,5 mol/L) e complexicidade da matriz, procedendo-se, neste último caso, ao estudo da libertação dos compostos voláteis a partir de dispersões de amido a 20% (m/m), gelatinizadas e não gelatinizadas. O amido foi seleccionado por se tratar do constituinte mais abundante da farinha de trigo e pela sua capacidade de formar complexos de inclusão com determinadas moléculas orgânicas (8).

Verificou-se que a extracção dos compostos voláteis aumenta, quer com o aumento da temperatura, quer com o tempo de contacto entre as duas fases. Para alguns compostos esta tendência geral não foi verificada, o que traduzirá o diferente comportamento dos compostos em estudo, dependendo das suas características químicas, face aos processos em que participam (difusão, partição entre a fase líquida e gasosa, adsorção/desorção). Com o aumento da força iônica, a 20°C e 45 min., verificou-se o aumento da quantidade de compostos extraídos, o que traduzirá a esperada diminuição da sua solubilidade na matriz.

A presença do amido não gelatinizado na fase aquosa levou à diminuição da quantidade extraída da maioria dos compostos. Apenas no caso da 2-acetylpiridina e do 2-feniletanol se observou um aumento da quantidade extraída. Os resultados obtidos até ao presente não permitem discernir qual dos factores, diminuição da difusão em fase aquosa devido ao aumento da viscosidade da matriz ou interacção específica (composto

volátil)-amido, terá um papel predominante. Provavelmente ambos influenciam o processo e o seu efeito estará dependente das características químicas dos compostos em estudo. Qualitativamente verificou-se um comportamento semelhante quando a matriz estudada foi amido gelatinizado, o que sugere que a maior liberação de amilose a partir dos grãos de amido, promovendo a provável complexação de alguns dos compostos em estudo, não será um factor predominante nem suficiente para se opor à maior taxa de liberação esperada a temperaturas mais elevadas.

Referências:

1. Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 64, 1187-1199, (1992).
2. Zhang, Z.; Yang, M. J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 66, 844A-853A, (1994).
3. Zhang, Z.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 65, 1843-1852, (1993).
4. Mindrup, R. F. *Supelco Internat.* 14(1), 2-5, (1996).
5. Yang, X.; Peppard, T. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1925-1230 (1994).
6. Grosh, W. e Schieberle, P. *Cereal Chem.*, 74(2): 91-97, (1997).
7. Seitz, L. M., Chung, O. K. e Rengarajan. *Cereal Chem.* 75(6):847-853, (1998).
8. Tomasik, T. e Schiling, C. H., Em *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Derek Horton (Ed.), vol. 53, Academic Press, New York, 1998, p.345-427.

P8. Pirazinas em Sementes de Cacau Torradas

M. H. G. Almeida, R. Carreira, M. G. Lourenço

Centro de Investigação de Ciências Agrárias Tropicais, Departamento de Agro-indústrias e Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa códex, mhga@mailcity.com

1. Introdução

As pirazinas são compostos azotados de cadeia heterocíclica que desempenham um papel importante no *flavour* de muitos produtos e que possuem propriedades sensoriais potentes e características (Maga, 1982). Estes compostos são particularmente importantes nos alimentos, tendo sido já identificados em mais de 50 produtos diferentes. Embora possam estar presentes em produtos crus, são os que foram submetidos à acção do calor que apresentam maiores quantitativos. Os microrganismos podem também introduzir pirazinas nos produtos em que se encontram.

Nas sementes de cacau torradas, as pirazinas são o grupo químico dominante entre os mais de 500 compostos voláteis identificados, correspondendo a cerca de 17% do número total de compostos (Nijssen *et al.*, 1996). Por outro lado, devido aos elevados teores em que estão presentes e aos baixos limiares de detecção, algumas pirazinas encontram-se entre os compostos odoríferos principais do cacau torrado (Chanliau, 1995; Schnermann e Schieberle, 1997; Almeida e Pires, 1999).

Embora a presença de pirazinas tenha sido detectada em muitos dos estudos realizados sobre os compostos voláteis do cacau, são reduzidos os trabalhos em que estes compostos são quantificados e, mesmo nesses, é notória a disparidade de resultados entre os diferentes autores (Almeida, 1998).

O objectivo deste trabalho foi identificar e quantificar pirazinas em sementes de cacau torradas, provenientes de duas diferentes zonas de produção (São Tomé e Príncipe e Brasil).

2. Material – Sementes de cacau comercial provenientes de São Tomé e Príncipe e do Brasil que foram sujeitas a tratamentos pós-colheita diferentes.

3. Torra e moenda da amostra - A torra foi realizada a 156°C durante 27min (Almeida, 1998). Os cotilédones das sementes torradas foram arrefecidos com azoto líquido e moídos em moinho de facas (500µm), sendo depois conservados a -40°C.

4. Determinação das pirazinas – Utilizou-se a seguinte metodologia descrita em Almeida *et al.* (1999): Isolamento por destilação por arrastamento de vapor; identificação e quantificação por Cromatografia Gás-Líquido.

5. Resultados e discussão – Foram quantificadas doze pirazinas diferentes, cujos teores estão apresentados no quadro seguinte. Apresenta-se, também, os valores extremos referidos na bibliografia para os compostos estudados.

Teores de pirazinas das amostras

Pirazinas*	teores nas amostras** (ppm)								
	STS	STL	STP	STT	BS	BM	Bnd	Bd	Bibliografia
2,5Dp	0,629	0,489	0,757	1,410	1,158	1,294	1,046	1,819	0,02-5,6
2,6Dp	0,404	0,353	0,445	0,636	0,542	0,522	0,479	0,597	0,1-3,5
2,3Dp	0,657	0,648	0,808	1,124	0,739	0,902	1,064	1,749	0,1-1,4
2(5)p	0,290	0,251	0,315	0,509	0,652	0,495	0,580	0,671	0,02-0,5
2(6)p	0,350	0,277	0,399	0,666	0,678	0,679	0,537	0,819	0,02-0,2
Trp	3,251	2,660	4,110	4,361	2,683	4,379	4,310	10,145	0,1-10,6
2(3,6)Dp	1,236	1,012	1,048	1,460	2,025	1,862	2,009	3,219	0,62-1
2(3,5)Dp	0,898	0,663	0,960	1,072	0,807	1,283	1,187	2,082	-
Tetp	2,883	3,877	4,571	3,904	1,034	7,909	27,567	85,207	0,1-16,4
2,3(5)p	0,295	0,240	0,243	0,338	0,558	0,571	0,481	0,711	0,03-0,56
3,5(2)p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,530	3,264	0,14-2,1
2,5D3(3)p	0,405	0,344	0,305	0,530	0,633	0,776	0,569	0,866	-
Total	11,298	10,814	13,961	16,010	10,951	20,672	41,359	111,149	-

* 2,5Dp=2,5-dimetilpirazina; 2,6Dp=2,6-dimetilpirazina; 2,3Dp=2,3-dimetilpirazina; 2(5)p=2-etil-5-metilpirazina; 2(6)p=2-etil-6-metilpirazina; Trp=2,3,5-trimetilpirazina; 2(3,6)Dp=2-etil-3,6-dimetilpirazina; 2(3,5)Dp=2-etil-3,5-dimetilpirazina; Tetp=2,3,5,6-tetrametilpirazina; 2,3(5)p=2,3-dietyl-5-metilpirazina; 3,5(2)p=3,5-dietyl-2-metilpirazina; 2,5D3(3)p=2,5-Dimetil-3(3-metilbutil)-pirazina, **ST=São Tomé e Príncipe; B= Brasil; M=secagem em secador mecânico; S=secagem directa ao sol; L=secagem em secador de lousa; P=secagem em secador de plataforma; T=secagem em secador "Tromag"; nd=não despolpado; d=despolpado.

Destaca-se, tanto quanto nos é possível saber pela bibliografia consultada, que foi possível quantificar, pela primeira vez, a 2-etil-3,5-dimetilpirazina e a 2,5-Dimetil-3(3-metilbutil)-pirazina que são importantes compostos odoríferos principais do cacau.

Bibliografia

- ALMEIDA, M. H. G. (1998) – *Cacau, Tecnologia pós-colheita. A fracção volátil do "flavour"*, Dissert. Dout. Eng. Agro-industrial, Lisboa, ISA.
- ALMEIDA, M. H. G. e PIRES, A. M. (1999) – *Flavour a cacau: identificação de compostos odoríferos principais*. Proposto para participar no 1º Encontro de Cromatografia, Lisboa, 13,14 e 15 de Dezembro de 1999.
- ALMEIDA, M. H. G.; RODRIGUES, S. M. B.; LOURENÇO, M. G. (1999) - Determinação de compostos voláteis em cacau por Cromatografia Gás-Líquido, In: *Livro de actas do 4º Encontro de Química dos Alimentos*, Coimbra, Sociedade Portuguesa de Química e Universidade de Coimbra, 180-182.
- CHANLIAU, S. (1995) - *Influence du traitement post-recolte et de la torrefaction sur le developpement de l'arome cacao. Essais préliminaires de caractérisation des composés odorants*. Diplôme d'études approfondies. Montpellier, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- MAGA, J. A. (1982) - Pyrazines in flavour. In: MORTON, I. D. e MACLEOD, A. J. (eds.), *Food Flavours. Part A. Introduction*, Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier Scientific Publishing Company, 283-323.
- NIJSEN, L. M.; VISSCHER, C. A.; MAARSE, H.; WILLEMSSENS, L. C. e BOELENS, M. H. (1996) – Cocoa. In: *Volatile compound in food. Qualitative and quantitative data*, Zeist, TNO Nutrition and Food Research Institute, 71.1-71.16.
- SCHNERMANN, P. e SCHIEBERLE, P. (1997) – Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3): 867-872.

Agradecimentos

À Mantero-Agricultura e Comércio Internacional SA e ao doutor Rogério Serôdio pela cedência das amostras de cacau de São Tomé e Príncipe e do Brasil, respectivamente

P9. Determinação de THM's em Águas de Abastecimento por SPME-CGC-ECD

Maria L.L. Monteiro^{1,2}, J.M.F. Nogueira¹, C. Santos²

¹ DQB/FCUL - Campo Grande Ed. C1, 5º Piso, 1749-016 Lisboa, nogueira@fc.ul.pt

² Laboratório de Pro-Qualidade SA – Rua Stinville n.º 2, 2830-144 Barreiro

É actualmente do conhecimento geral que, o processo de tratamento de águas de abastecimento por cloração, leva à formação de compostos voláteis que podem, quando presentes em níveis elevados, afectar a saúde dos consumidores, designados de trihalometanos (THM's). Deste modo, há a necessidade de controlar e monitorizar os níveis de trihalometanos existentes nas águas de consumo humano.

Neste sentido, foi desenvolvido o método por microextracção em fase sólida (SPME) para monitorizar cinco trihalometanos (CHCl_3 , CCl_4 , CHCl_2Br , CHClBr_2 e CHBr_3) em águas de abastecimento, sendo a análise efectuada por cromatografia gasosa capilar com detecção por captura electrónica (CGC-ECD).

Deste modo, procedeu-se ao estudo das condições óptimas de análise dos THM's por SPME, tendo sido utilizada como fase estacionária um revestimento polimérico de carboxeno/PDMS de 75 μm e a extracção efectuada por espaço de cabeça (*headspace*). Verificou-se que os parâmetros influentes na extracção são os determinantes na análise dos THM's, tendo sido encontradas as seguintes condições óptimas: $T=45^\circ\text{C}$; $V_{\text{agit}}=300\text{r.p.m.}$; $10\% < [\text{NaCl}] < 30\% \text{ (p/v)}$.

As constantes de distribuição estimadas para os analitos, são concordantes com as expectáveis para componentes voláteis, evidenciando no entanto, valores inferiores aos apresentados por outros autores, quando usam fibras com revestimento polimérico de dimetilpolisiloxano de 95 μm .

O estudo de implementação do método evidenciou curvas de calibração lineares para uma gama de concentração compreendida entre 0,1 e 2 $\mu\text{g/L}$. Os limites de detecção obtidos por SPME-CGC-ECD, variaram entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/L}$, sendo mais baixos relativamente a outras técnicas analíticas convencionais e dando resposta aos níveis guia de 1 $\mu\text{g/L}$, referenciados pelo decreto-lei nº 236/98 de 1 de Agosto.

O método demonstrou ser selectiva mas não específica e revelou possuir uma precisão média razoável (1,5-2,8%RSD), sendo no entanto, inferior para os analitos com menor afinidade para a fase estacionária usada. Evidenciou igualmente, percentagens de recuperação muito baixas, especialmente para o clorofórmio.

As diversas amostras de água de abastecimento analisadas por SPME-CGC-ECD, evidenciaram níveis de THM's, acima do nível guia do decreto-lei.

Referências

- Magdic, Sonia, Pawliszyn, Janusz; “Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction”; *Journal of Chromatog. A* 723, 111-112, 1996.
- Pawliszyn, Janusz, “Solid Phase Microextraction: Theory and practice”, Wiley VCH, 1997.
- Eisert, Ralf; Leusen Karsten, “Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water”; *Journal of Chromatog. A* 733, 143-157, 1996.
- Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, *Diário da República* - Série I-A; nº 176/98, 1998.

P10. Monitorização de Trihalometanos em Águas de Consumo Humano por Cromatografia em Fase Gasosa com Injecção de “Head-Space” Estático

Ana P. Coimbra, G. M. Medeiros, Alice I. Mosca, N. Santos, F. Dias

CONTROLAB, Laboratório de Análises Químicas, Físicas e Biológicas, LDA

Lab. Inorgânica – Pta Aníbal Faustino, Nº 6 B, 2625-161 Póvoa de Sta Iria

Lab.Orgânica-Centro de Excelência do Ambiente, Univ. Nova Lisboa, 2825-Mte da Caparica

Um dos processos de tratamento de águas de consumo Humano (ACH) mais importante consiste na desinfecção.

Com esta operação pretende-se eliminar o risco de ocorrência de doenças, tais como, doenças gastrointestinais, doenças parasitárias, cólera, hepatite A e febre tifóide.

Para a destruição dos agentes patogénicos recorre-se quase sempre ao uso de reagentes químicos, sendo o cloro livre ou combinado, o biocida mais comum.

Um dos grandes problemas destes tratamentos prende-se com o facto destes compostos terem carácter oxidante e reagirem com outros compostos de natureza orgânica, presentes na água, quer de origem natural, quer artificial, originando subprodutos, alguns com potencial risco carcinogénico ou mutagénico. É neste grupo de compostos que podemos incluir os Trihalometanos (THM).

Da adição à agua de cloro gasoso ou na forma de hipoclorito formam-se as espécies activas ião hipoclorito ou ácido hipocloroso que em contacto com substâncias húmicas, com compostos solúveis segregados pelas algas, compostos azotados e bromo dão origem aos THM.

Por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) quando for necessário decidir entre os parâmetros microbiológicos e os parâmetros referentes a subprodutos da desinfecção, a qualidade microbiológica deve ter sempre precedência.

Neste âmbito pretende-se com o presente trabalho monitorizar a presença de THM numa água de consumo humano produzida a partir de uma captação de água superficial – captação de rio.

O controlo decorreu entre Março de 1998 e Setembro de 1999, com periodicidade semanal, correspondendo a cerca de 80 amostras, das quais serão analisadas as referentes a 4 pontos de amostragem da rede pública, um Hotel, um Posto médico, um bar e um café.

Tecnicamente aplicou-se um método cromatográfico, utilizando uma coluna capilar de fase DB 5, 30 m, 35 mm e 0,25 µm, e detecção por captura de electrões (ECD), detector específico e de elevada sensibilidade a compostos halogenados. Recorreu-se à técnica de injeção de “head space” estático. Esta técnica consiste em fazer tomas de 5 ml de água para frascos de 10 ml, que são devidamente encapsulados. Estes são aquecidos e mantidos a 60°C durante 20 min, para assegurar o equilíbrio de fase Líquido-Vapor. Uma seringa tipo “gas tight” é aquecida a temperatura superior a 60°C para evitar fenómenos de condensação e é injectado no cromatografo 1 ml do vapor localizado no espaço de cabeça do frasco.

O método de quantificação baseou-se na aplicação da Norma ISO 8460, usando recta de calibração pelo método de padrão externo para os compostos Clorofórmio, Bromodiclorometano, Clorodibromometano e bromofórmio.

Pretende-se confrontar os teores encontrados com os valores referidos na legislação nacional, comunitária e valores da OMS e estabelecer valores guia para o total de THM , assim como referenciar o limite de detecção do método.

Como conclusão apontam-se condições que permitem a optimização dos binómios desinfecção/teor de matéria orgânica na água de partida e desinfecção/teor de subprodutos na água de consumo.

Referências

ISO 8140

Hemetério Monteiro, Águas e Resíduos-Ano I, Julho de 1996

C.A.Weston, R.P.Albert, D.N. Speis, L.Williams and W.Martin, American Laboratory, 30-35, December 1992

P11. Isolamento e Análise de Marcadores Químicos de Poluição

M. Tojeiro, M. Gonçalves, H. Chaves das Neves

Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, U.N.L.

Quinta da Torre, 2825-114 Caparica

A poluição de origem fecal (efluentes domésticos ou agrícolas) constitui um grave problema de saúde pública pois provoca a contaminação de águas e sedimentos com microorganismos patogénicos. Os métodos microbiológicos utilizados tradicionalmente na monitorização deste tipo de contaminação apresentam a desvantagem de serem afectados pela variabilidade inerente aos sistemas biológicos para além de não fornecerem informação sobre a fonte de contaminação¹.

A utilização de marcadores químicos de poluição fecal, como sejam os álcoois e cetonas esterólicos tem sido frequentemente proposta como metodologia alternativa¹⁻⁸. A quantificação dos compostos esterólicos presentes em águas e sedimentos permite avaliar o grau de contaminação orgânica e identificar as principais fontes de poluição fecal.

A implementação desta metodologia em programas de monitorização ambiental tem no entanto sido dificultada pela complexidade e morosidade dos métodos analíticos propostos. A sequência de operações a realizar para isolar e quantificar a fraccção esterólica, no caso de amostras de água^{2,3} é esquematizada na Figura 1:

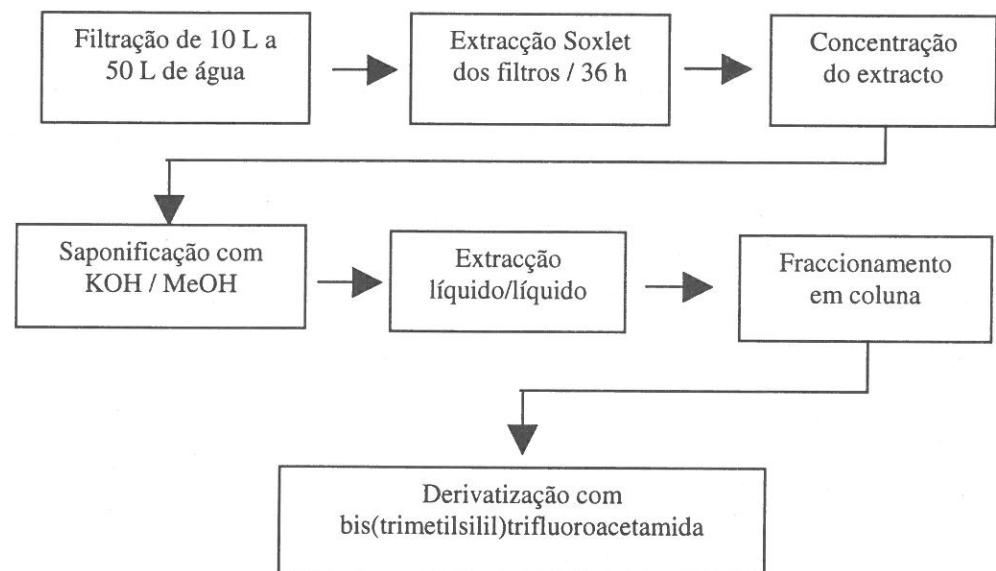


Figura 1: Sequência de operações a realizar para proceder ao isolamento de compostos esterólicos a partir de amostras de água

Neste trabalho pretendemos estudar a utilização da técnica de microextração em fase sólida no isolamento de álcoois e cetonas esterólicos a partir de água, com o objectivo de simplificar o processo analítico global. A quantificação dos analitos extraídos foi efectuada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama.

Os parâmetros optimizados no método de SPME foram: o tempo de adsorção e de desorpção, o efeito de "salting-out" e o tipo de fibra utilizada.

Após optimizados estes parâmetros foi construída uma recta de calibração e foram determinados os limites de detecção e de quantificação do método.

Referências

1. R. Leeming, A. Ball, N. Ashbolt, P. Nichols Wat. Res., 30, 12, (1996) p. 2893,
2. J. Grimalt, P. Fernandez, J.M. Bayona, J. Albaigés, Environ. Sci. Technol., 24, (1990) p. 357,
3. P. D. Nichols, R. Leeming, M.S. Rayner, V. Latham, J. of Chromatography A, 733 (1996), p. 497
4. M. W. Rhodes, H. Kator, Appl. Environ. Microbiol., 54 (1988) p. 2902
5. J. C. Geldenhuys, P. D. Pretorius, Water Sci. and Technol., 21 (1989) p. 105
6. P. G. Hatcher, P. McGillivray, Environ. Sci. Technol., 13 (1979) p. 1225
7. M. M. Krahn, C. Wigren, L. K. Moore, D. W. Brown, J. of Chromatography A, 481 (1989) p. 263
8. S. M. Mudge, M.J.A.F. Bebianno, J.A. East, L.A. Barreira, Wat. Res., 33, 4, (1999), p. 1038

P12. Caracterização Físico-Química de Águas Doces Subterrâneas e Superficiais

A.I. Mosca; P.Coimbra; G.Medeiros; M.J. Santos; M.F. Dias
Controlab, Lda - Pta Aníbal Faustino nº6-B, Quinta da Piedade, 2625-Póvoa de Sta Iria

As águas subterrâneas têm sido tradicionalmente consideradas como fontes de água mais puras do que as águas superficiais. O facto de serem naturalmente filtradas através do solo e de permanecerem longos períodos de tempo no subsolo, faz com que apresentem teores mais baixos de matéria orgânica bem como menos microrganismos patogénicos que as águas superficiais. No entanto, a crescente contaminação destas águas com poluentes químicos tem vindo a suscitar preocupações cada vez maiores.

O estudo levado a cabo neste trabalho comprehende a monitorização de quatro amostras de águas subterrâneas (um furo dos serviços municipalizados para captação de água para consumo humano e três furos particulares) e uma amostra de água superficial (uma ribeira). Todas as amostras foram colhidas num raio inferior a 5 Km e durante 12 campanhas a intervalos regulares durante 6 meses (inicio de Janeiro a final de Maio de 1998). Os pontos de amostragem apresentavam como principais fontes de possíveis contaminações uma lixeira municipal e os resíduos resultantes das práticas agrícolas da região (essencialmente vinha e pastorícia).

De entre os vários parâmetros físicos e químicos analisados apenas serão discutidos neste trabalho os referentes ao diagrama da fig.1 sendo, no entanto, correlacionados com outros parâmetros analisados tais como pH, Carência Química de Oxigénio (CQO), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO5), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) e Carbono Orgânico Total (TOC)

Para a monitorização dos anões (Fluoretos, Cloretos, Fosfatos, Nitratos e Sulfatos) recorreu-se à cromatografia iônica com detecção por conductividade e supressão electrolítica. Utilizou-se neste trabalho um cromatografo iónico DX 300 com uma pré coluna AG4+, uma coluna AS14 e um supressor de iões em autosupressão com água ASRS. O detector utilizado foi um detector electroquímico em modo de condutividade. Utilizou-se ainda uma fase móvel aquosa com 1,0mM NaHCO₃ e 3,5 mM Na₂CO₃ com um fluxo de 1,2 ml/min, tendo as amostras sido injectadas directamente num loop de 50µl.

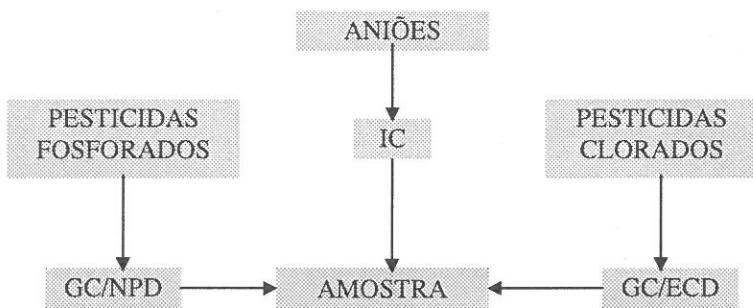


Fig. 1

No que respeita à determinação dos pesticidas organoclorados foram monitorizados 11 pesticidas. Foi efectuada uma extração líquido/líquido com uma mistura de n-hexano/éter dietílico (85:15) com posterior concentração sob fluxo de azoto a 10 ml. A análise foi efectuada num cromatografo gasoso (Carlo Erba) com uma coluna capilar DB-608 (J&W) 15m, 0,53mm I.D e 0,85 μ m de espessura de filme e um detector de captura electrónica.

Foram ainda analisados 5 pesticidas organofosforados por cromatografia gasosa utilizando um cromatografo Fisons, com uma coluna DB-17 (J&W) 30m, 0,53mm I.D e 1 μ m de espessura de filme e um detector específico de azoto e fósforo. Foi levada a cabo uma extração líquido/líquido com diclorometano a cerca de 3L de cada amostra com posterior concentração a 1 ml em evaporador rotativo. Os volumes de amostra para a determinação de pesticidas organofosforados e organoclorados foi de cerca de 3L por amostra.

Como conclusão geral do trabalho ressalta o facto de se terem observado teores de contaminação superiores na amostra de água superficial, em especial no que se refere ao teor em anões. No que respeita às águas subterrâneas é de referir que a analise química permite distinguir amostras recolhidas a diferentes profundidades pelos seus contaminantes caracteristicos.

P13. Implementação e Validação de um Método Cromatográfico para a Quantificação de um Herbicida

Marta Luz^{1,2}, J.M.F. Nogueira¹, Paula Mestre²

¹ DQB/FCUL - Campo Grande Ed. C1, 5º Piso, 1749-016 Lisboa, nogueira@fc.ul.pt

² Rhône Poulec Agro, Alto da Bela Vista, 2735 Cacém

Introdução

O Propariz é um herbicida formulado na fábrica da Rhône Poulec Agro no Cacém, cuja substância activa é o propanil - propionamida - devendo a concentração nominal média ser de 360g/L no produto final.

O método da cromatografia gás-líquido (GLC), utilizando como detector a ionização de chama (FID), tem sido adoptado para quantificar substâncias activas presentes em herbicidas [1].

A construção de uma curva de calibração com uso de padrão interno e a aplicação do método da adição padrão, permitem estimar a concentração de propanil nas amostras de Propariz.

A validação do método cromatográfico pode ser feita através de testes estatísticos adequados, que permitam avaliar o bem desempenho do mesmo [2].

No presente trabalho, a linearidade na gama de concentração estudada, a selectividade e a precisão e exactidão, foram igualmente avaliadas, tendo-se procedido igualmente à estimativa dos limite de detecção e quantificação.

Experimental

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo HP 5890 series II com detector FID, sendo a coluna de enchimento a OV-17. Utilizou-se azoto como gás de arrastamento e a programação da temperatura do forno foi linear.

A curva de calibração foi efectuada com soluções padrão constituídas pelo herbicida padrão (propanil) e padrão interno (DMF). As concentrações destas soluções foram aproximadas à concentração do herbicida a quantificar na amostra formulada (após as respectivas diluições).

No método da adição padrão, adições crescentes de padrão propanil foram adicionadas às amostras de Propariz.

Resultados e Discussão

A curva de calibração usada após estabelecimento de condições cromatográficas optimizadas é a apresentada na figura 1. Observa-se nítida linearidade no intervalo de concentrações estudado (0,1-0,3g/L), tendo sido confirmada através dos testes da Homogeneidade de Variâncias, Mandel, Homogeneidade de Coeficientes de Variação e Análise de Resíduos.

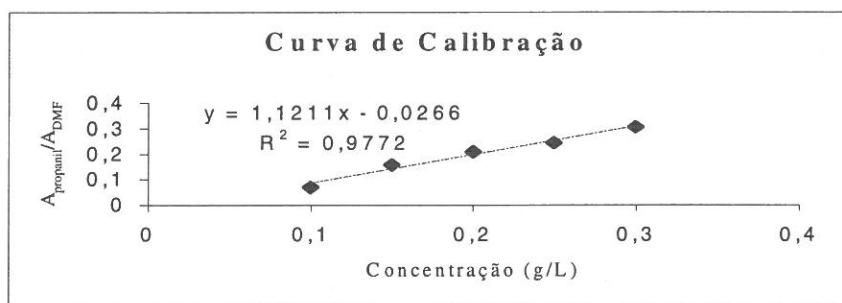


Figura 1 - Curva de calibração obtida para doseamento do propanil.

Por aplicação do método de adição de padrão a amostras do herbicida Propariz, obteve-se boa linearidade nas recuperações de propanil, como pode ser observado na figura 2.

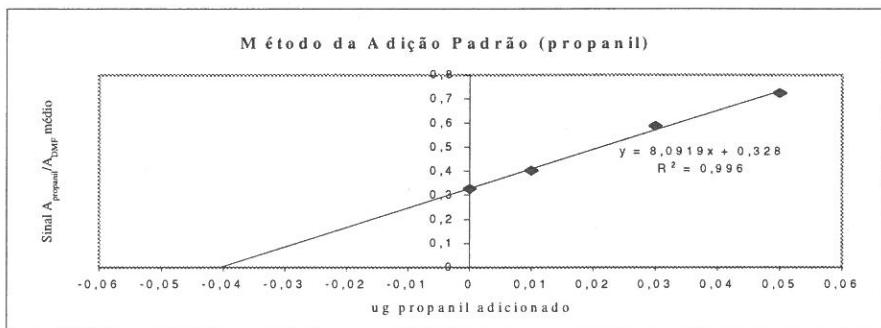


Figura 2 - Aplicação do método da adição padrão a amostras de Propariz.

Conclusões

O método cromatográfico (GC-FID), mostrou ser selectivo ao propanil, apresentando a curva de calibração obtida excelente linearidade na gama de concentrações estudadas (0,1 até 0,3g/L), como comprovaram os testes estatísticos efectuados.

Através do desvio padrão residual da recta ($S_{Y/X}$), calculou-se o limite de detecção ($LD=0,0246\text{g/L}$) e o limite de quantificação ($LQ=0,0820\text{g/L}$).

Os testes de repetibilidade efectuados à precisão do método evidenciaram níveis significativos (6-13).

A exactidão do método foi analisada com recurso ao método da adição de padrão a amostras de Propariz, tendo-se obtido recuperações com cerca de 98%.

Após o método cromatográfico implementado e validado, verificou-se que a concentração nominal média de propanil nas amostras produzidas na fábrica é de 357,0g/L.

Referências

- [1] M. Douglas Hartley, Hamish Kidd, The Agrochemicals Handbook, Royal Society of Chemistry, 2nd edition, 1987.
- [2] Validation of Chromatographic Methods -Reviewer Guidance, Center for Drug valuation and Research (CDER).

P14. Análise por CG-EM de Compostos Voláteis de Madeiras Utilizadas no Envelhecimento de Aguardentes

Ilda Caldeira; Maria Cristina Clímaco; A. Pedro Belchior
Estação Vitivinícola Nacional. INIA. 2565-191 Dois Portos. Portugal.
E-mail:inia.evn@mail.telepac.pt

INTRODUÇÃO

Os compostos voláteis existentes numa quartola de madeira podem ser compostos originários da madeira ou outros que se formaram durante o aquecimento realizado no seu fabrico, operação esta designada por queima, os quais tem uma grande influência no aroma de bebidas alcoólicas envelhecidas. Os estudos desenvolvidos tem incidido fundamentalmente sobre a madeira de carvalhos franceses e americanos [1,2,3]. Chatonnet [4] apresenta uma boa revisão bibliográfica sobre os compostos aromáticos da madeira de carvalho

Neste trabalho pretende-se apresentar os resultados relativos à composição de uma madeira de carvalho português (CNG), a qual deu origem, em estudos anteriores [5], a aguardentes de boa qualidade comparativamente a uma de carvalho francês Limousin (CFL), tradicionalmente recomendada para o envelhecimento de aguardentes.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras – aparas de madeira de carvalho português (CNF) e carvalho francês Limousin (CFL), submetidas a diferentes níveis de queima (Q0-sem queima, QL-queima ligeira, QM-queima média; QF-queima forte).

Obtenção de um extrato hidroalcoólico de aparas – após optimização prévia, realizou-se a extração (3 h) de 5 g de aparas moídas em 100 ml de solução hidroalcoólica a 55% v/v, (pH 4.2), e com agitação mecânica.

Análise dos compostos voláteis

Extração e concentração – o extrato hidroalcoólico de aparas foi extraído com diclorometano, utilizando-se como padrões internos o 2-octanol e o 3,4-dimetilfenol, e concentrado até um volume de 200 µl (método adaptado de Coccito *et al.* [6]).

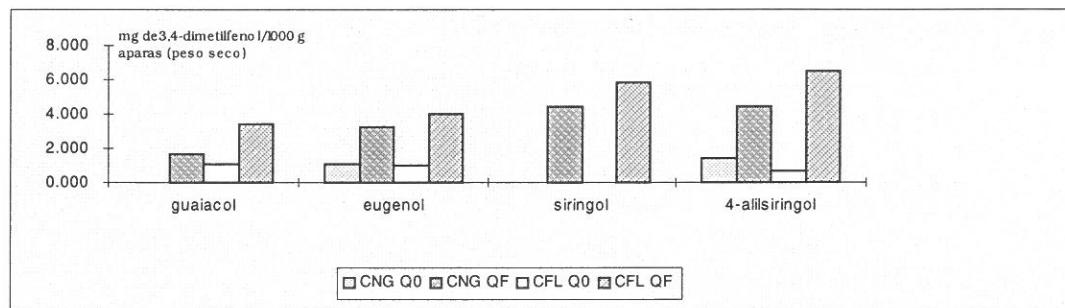
Análise cromatográfica – cromatógrafo (Carlo Erba 6000 Vega Series) com detector de ionização de chama (250°C), coluna capilar (DB-Wax-30mx0.32mmx0.25µm) e injector (250°C) com repartidor de fluxo (razão de repartição 1:15). A eluição foi realizada com hidrogénio (1,4 ml/min), em gradiente de temperatura de 45°C (5 min isotérmica) até 210°C (3,5°C/min) e 30 minutos a 210°C.

Identificação dos compostos – por comparação dos tempos de retenção com os de padrões analisados nas mesmas condições, em duas colunas, (DB-Wax e DB-225) e por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM).

RESULTADOS

Foram identificados 18 compostos de diferentes famílias químicas, nomeadamente 5-metil-furfural, furfural, 5-hidroximetil-furfural, 4-metil-guaiacol, guaiacol, eugenol, siringol, 2-fenil-etanol, 4-alil-siringol, ácidos acético, propanóico, hexanóico, octanóico e decanóico, vanilina, γ-lactona do ácido 4-hidroxi-buteno-2-óico, γ-lactona do ácido 4-hidroxi-3-metil-octanóico e 3-metil-1-butanol+2-metil-1-butanol.

A análise de variância aos resultados permitiu verificar que a madeira CFL apresentava relativamente à CNG, teores significativamente mais elevados nos seguintes compostos γ -lactona do ácido 4-hidroxi-buteno-2-óico, ácido hexanóico, guaiacol, 4-metil-guaiacol, 4-alil-siringol e vanilina. No que respeita à queima, foi possível verificar que este procedimento tecnológico provocou um aumento significativo do teor de vários compostos nomeadamente furfural, 5-metil-furfural, 5-hidroximetil-furfural, guaiacol, eugenol, sinringol, 4-alil-siringol, ácido octanóico e vanilina, resultados estes concordantes com os obtidos por outros autores [1] em madeiras de carvalho francês. No gráfico seguinte apresentam-se os resultados de alguns dos fenóis voláteis, para as duas madeiras e nas duas situações extremas de queima (Q0-sem queima, QF-queima forte).



Referências bibliográficas

- 1-Chatonnet P. (1995) Doctorat Thesis . Universidade Bordéus.
- 2-Masson G., Guichard E.; Fournier N.; Puech J.-L. (1995) *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 424-428.
- 3-Sefton M.A.; Francis I. L., Pocock K. F., Williams P. J. (1993) *Science des Aliments* 13:629-643.
- 4-Chatonnet P.(1992) In: *Le bois et la qualité des vins et eaux-de-vie*, 81-91, Vigne et Vin Publications Internationales, Martillac.
- 5-Caldeira I., Canas, S., Costa S., Lopes C.; Carvalho E., Belchior A. P. (1998) In *L’Oenologie de l’Avenir et la Qualité de Vie*. p. 528., XXIII Congrès Mondial de la Vigne et du Vin. Lisboa, Portugal.
- 6-Coccito C., Gaetano G., Delfini C. (1995) *Food Chemistry* 52:311-320.

P15. Análise de Compostos Voláteis de Pêssegos e Damascos por Microextracção em Fase Sólida

Ana Fraga^{1,2}, M. Rosário Bronze^{1,2}, Luís Vilas Boas^{2,3}

¹ Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

² Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

³ Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

INTRODUÇÃO

O período de consumo de frutas é relativamente curto pelo que podem ser sujeitas a transformações agro-industriais. Processos como a secagem ou a desidratação osmótica têm sido frequentemente utilizados com este objectivo. Durante o processamento, a fruta sofre alterações pelo que terá todo o interesse estudar a composição química dos frutos frescos e dos produtos resultantes. Nesse sentido estão a ser feitos estudos para optimizar as condições de análise das frutas e produtos afins e o trabalho descrito nesta comunicação está na sequência de outros estudos [1,2].

Produtos de desidratação osmótica de frutos estão a ser estudados por meio de técnicas instrumentais de análise química tendo em vista a sua caracterização e posterior comparação de resultados com a avaliação sensorial.

Neste trabalho, apresentam-se os resultados preliminares obtidos no desenvolvimento de métodos de tratamento de amostra e análise tendo em vista o estudo de pêssegos, damascos e nectarinas.

A micro-extracção em fase sólida (MEFS) foi utilizada como técnica de preparação da amostra para análise de compostos voláteis, tendo sido utilizadas para o efeito fibras com diferentes revestimentos. A análise foi feita num cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrómetro de massa (GC-MS).

EXPERIMENTAL

Amostras de pêssego e damasco fresco bem como seccado foram cortadas e colocadas num frasco Schott (100 ml) que foi tapado. Fibras com diferentes revestimentos (PDMS 100 μm , PDMS/DVB 65 μm , DVB/CAR/PDMS 30 μm , Poliacrilato 85 μm da Supelco) foram postas em contacto, durante 60 minutos, com a “fracção de espaço de cabeça” em equilíbrio com a amostra no interior do frasco e à temperatura ambiente. No injector do cromatógrafo (Shimadzu) a 250°C, os compostos voláteis foram libertados e analisados numa coluna (DB1701P da JW, $l = 30$ m, d.i. = 0,25 mm) com o seguinte programa de temperaturas: 40 °C durante 5 min; rampa a 5 °C min^{-1} até 240 °C, 7 min a 240 °C. A identificação dos principais compostos presentes nas amostras foi feita por comparação com os espectros da biblioteca de espectros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 comparam-se os cromatogramas obtidos na análise da fração volátil em equilíbrio com uma amostra de pêssego quando se utilizaram fibras com diferentes revestimentos e foi possível fazer a identificação de alguns picos.

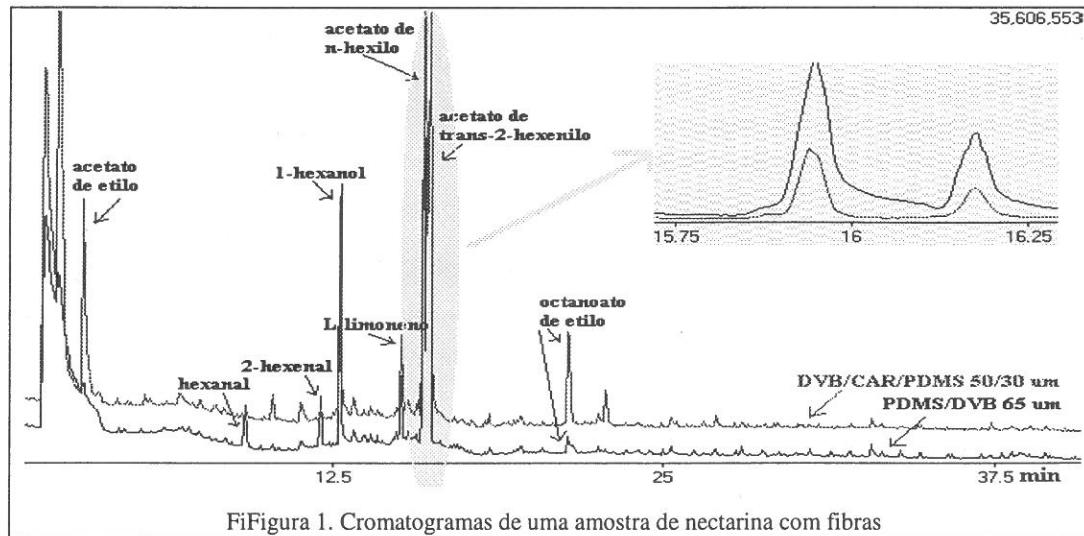


Figura 1. Cromatogramas de uma amostra de nectarina com fibras

A fibra com um revestimento de DVB/CAR/PDMS 30 μm era a mais eficiente na concentração dos compostos, dado que se obtinham áreas de picos bastante superiores quando esta fibra era usada. Na figura 2 comparam-se os perfis cromatográficos obtidos na análise de amostras de nectarina, pêssego e damasco seco.

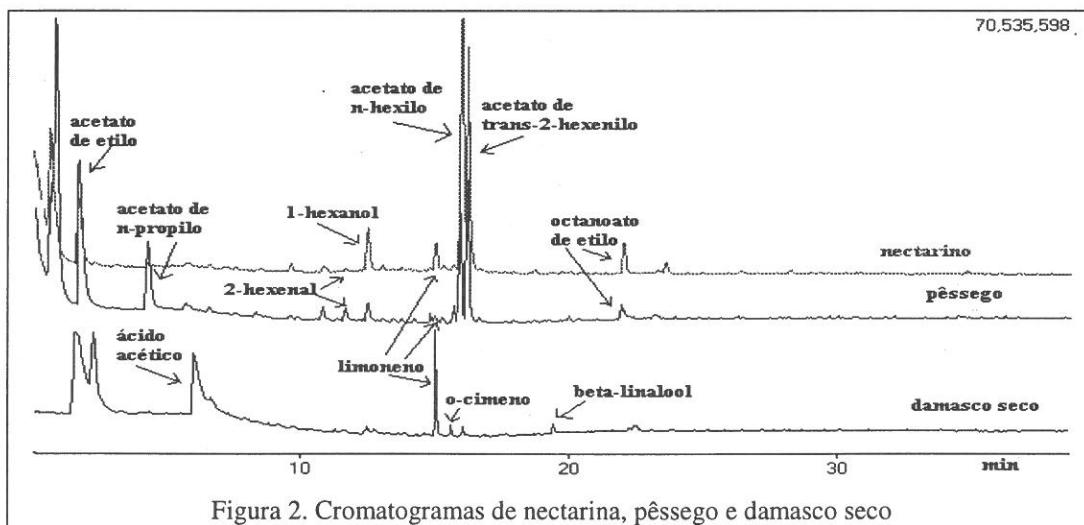


Figura 2. Cromatogramas de nectarina, pêssego e damasco seco

Conclui-se que a fibra mais adequada à concentração dos compostos voláteis era a de DVB/CAR/PDMS 30 μm por permitir diminuir o tempo de exposição da fibra à amostra. Esta vantagem é importante quando se analisam produtos naturais que facilmente sofrem alterações na sua composição química, como é o caso dos frutos.

Referências

- [1] M. Rosário Bronze *et al*, 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, 1999.
- [2] Ana Luísa Simplício, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia de Lisboa, 1998.

P16. *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff) Pest Management: A chromatographic overview

MATEUS, Eduardo⁽¹⁾; PAIVA, Maria Rosa⁽¹⁾ & PHELAN, Larry⁽²⁾

(1) GUECKO-DCEA / Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa, P – 2825-114

Monte de Caparica, PORTUGAL

(2) OARDC-Dept. of Entomology, Ohio State University, Wooster,

OH 44691-4096, USA

The winter pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* is one of the major defoliator pine pests in southern Europe and North Africa. In Portugal, the processionary moth attacks both endemic and introduced species. Severe pine defoliation, caused by the caterpillars, frequently occurs causing economic damage ⁽¹⁾. Additionally, humans are also plagued by this moth, since the larvae possess urticating hairs, which cause irritation to the skin and mucous membranes, often leading to severe allergic reactions.

The chemical structure of the sex pheromone of *T. pityocampa* was identified as (Z)-13-hexadecen-11-ynyl acetate ⁽²⁾. Traps baited with the synthetic pheromone have been frequently used in several Mediterranean countries, mainly for monitoring the phenology of male flight activity, but occasionally also aiming at masstraping and population dynamics studies.

Monitoring the adult flight periods can provide an approach to the forecast of the peaks of larval hatching and defoliation, as well as an estimation of the threshold of economic damage.

However few data are available regarding the pheromone biology of this insect defoliator and the composition of the volatiles emitted by the dispensers used to bait the traps.

The present study compared the pheromone emissions of virgin females, 1 to 5 days old, with those of synthetic baits. The abdominal tips of calling females were cut and extracted with pentane and cleaned up with silica gel. The volatiles emitted by the pheromone dispensers were analysed by purge & trap.

The analysis were performed using a HP-5890 chromatograph connected to a Mass Selective Detector HP-5970 with a MS-Chemstation. The column used for all analysis was a DB-5 with a 30mm x 0.32 mm i.d. and 1.0 μ m film tickness (J&W Scientifics, Folsom, USA).

In this poster some preliminary results are presented. Figure 2 shows that the sex pheromone is a trace peak among the volatile components emitted by the dispensers. The amounts of pheromone extracted from the abdominal tips of virgin females were not related to female age, which contrasts with previous observations indicating an age dependent pheromone emission for this defoliator.

⁽¹⁾ Lamy, M., 1990: J. Applied Entomology 110, 425-437

⁽²⁾ Gerrero, A. et al: Tetrahedron Letters 22, 2013-2016

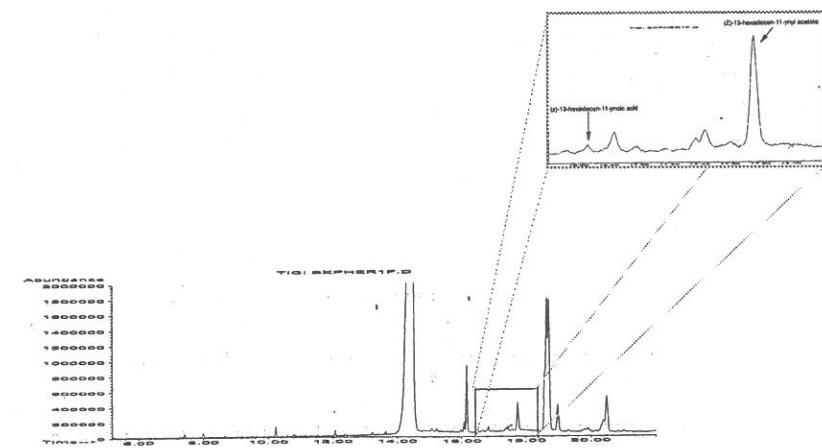


Figure 1: Total ion chromatogram of an abdominal tip extract obtained from a *T. pityocampa* virgin female with a close up of the pheromone region.

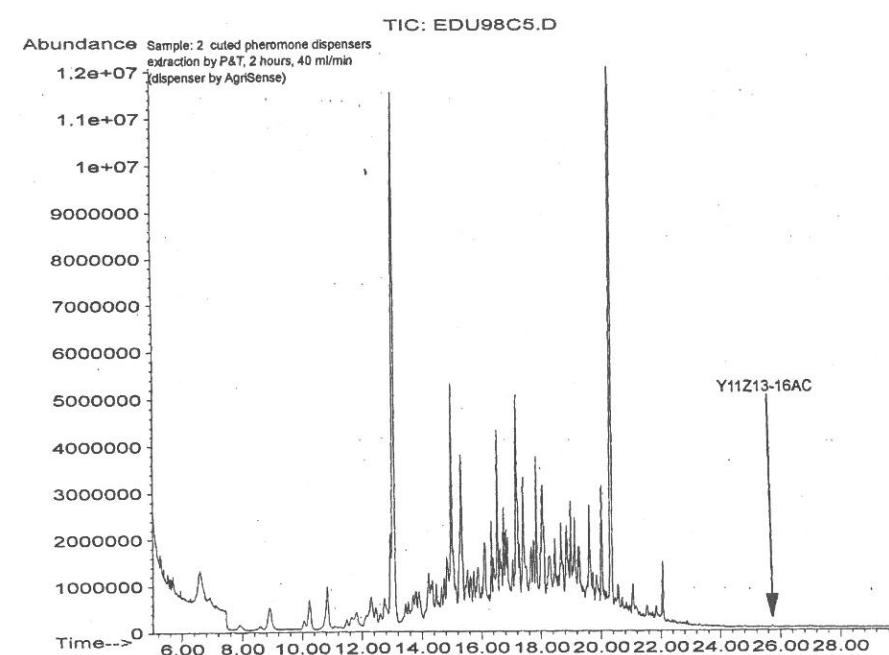


Figure 2: Total Ion Chromatogram from the pheromone trap dispenser obtained by purge and trap

P17. Comparative Study of the Aromas of Ten Pinus Species Using Olfactroscopy and High Resolution Chomatography.

MATEUS, Eduardo; MUNHÁ, José C.; PAIVA, Maria Rosa
GUECKO-DCEA / Faculty of Sciences and Technology / New University of Lisbon
P – 2825 - 114 Monte de Caparica, PORTUGAL

The analysis of the terpene composition emitted by different trees has proved useful in a wide variety of studies. Thus chemotaxonomy was used to characterise some coniferous species and this tool can further be exploited to decode insect-pine interactions ^[1]. A new tool is now used to evaluate differences in the pinus species "bouquet": the AromaScan®.

Ten pine species, 3 native ones, *Pinus halepensis*, *P. pinea* and *P. pinaster*, and 7 introduced ones, *P. brutia*, *P. patula*, *P. radiata*, *P. taeda*, *P. elliottii*, *P. kesyia* and *P. sylvestris* were sampled in central Portugal, Abrantes, region.

The aroma analysis of *Pinaster* species was performed using a sensor array detection device equipped with a multi-element array of 32 chemical sensors. The plant material studied consisted of pine needles from ten pine species. A multivariate analysis (Sammon Mapping ^[2] (figure 1)) of the data was carried out in order to summarise the sensor responses.

In addition, 0.85g ±0.02g of needles, were taken from each species, cut and transferred to 7.0 ml vials (Supelco, Bellefonte). After 30 minutes equilibrium at room temperature, the headspace was extracted by solid phase microextraction (SPME) during 45 minutes, using a 100 µm PDMS fiber (Supelco, Bellefonte). Following extraction, the fiber was thermally desorbed and the compounds eluted separated in a DB-5 capillary column, with a 30 m x 0.32 mm i.d. and 1.0 µm film (J&W, Scientific, Folsom).

The Sammon Map produced was compared with a previous study of Principal Components Analysis (PCA) obtained using the monoterpenes peaks areas of the monoterpenes identified from the ten *Pinus* species [1].

Results suggest a better correlation of the Sammon Mapping than the PCA with the level of attack by an insect defoliator, the pine processionary moth. The cluster distance from the origin obtained with the Sammon Mapping is inversely correlated with the level of attack by the insect defoliator.

An apparent discrepancy was observed for *P. patula*, for which the attack level was low. This observation might be explained by the morphological characteristics of *P. patula*, such as long and soft needles in comparison to other pine species which could deter feeding and oviposition by *T. pityocampa*.

^[1] MATEUS E. P. et al, Differentiation of twelve pine species from central Portugal by monoterpane composition analysis using HS-HRGC. – Nineteenth International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis May 18-22, 1997- Wintergreen, Virginia USA pp 338

^[2] AromaScan Manual, AromaScan Inc., Hollis, U.S.A.

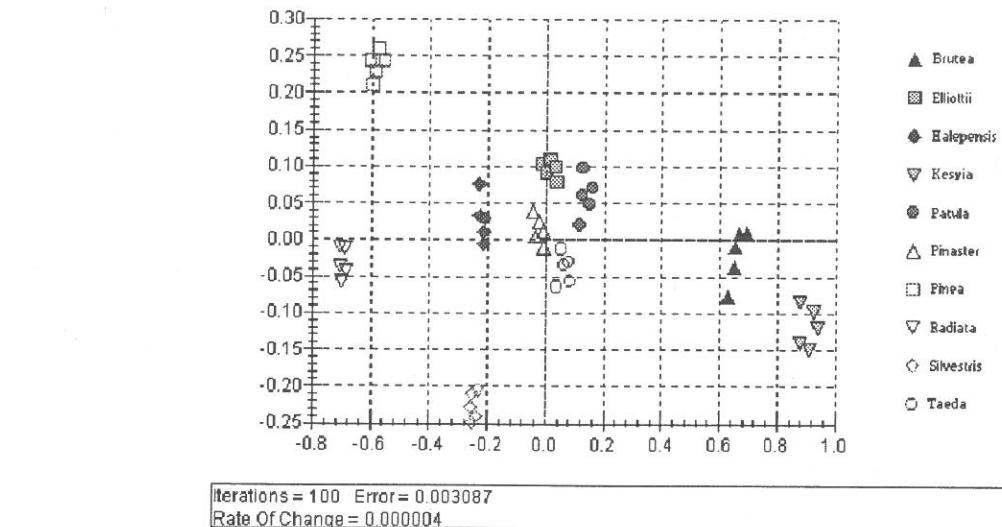


Figure 1 – Sammon Mapping of the ten species of *Pinus* produced with the AromaScan data

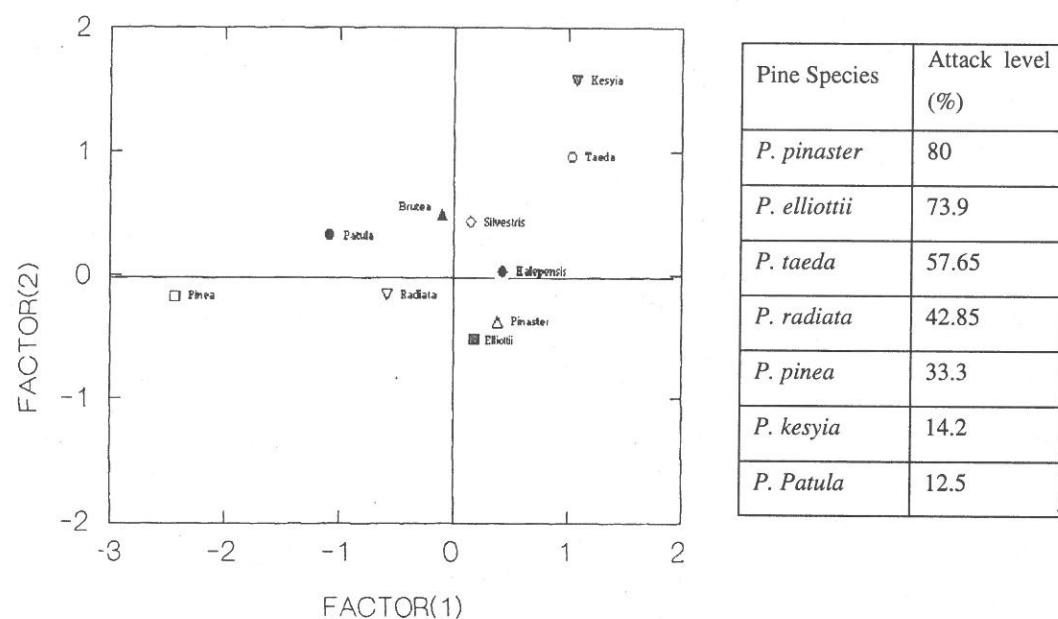


Figure 2 – PCA of the ten Pinus species analysed, produced with peak areas of the monoterpenes obtained by chromatography and attack levels by the processionary moth of seven pine species.

P18. Flavour a Cacau: Identificação de Compostos Odoríferos Principais

M. H. G. Almeida, A. M. Pires

Centro de Investigação de Ciências Agrárias Tropicais, Departamento de Agro-indústrias e Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa códex, mhga@mailcity.com

1. Introdução

O odor a cacau é devido a mais de 500 compostos (Nijssen *et al.*, 1996) sem que, até hoje, tenha sido possível apontar um que, por si só, o possa representar.

Os compostos odoríferos principais do cacau só muito recentemente foram objecto de estudo através dos trabalhos de Chanliau (1995) e Schnermann e Schieberle (1997) que utilizaram o método de diluição do odor

AEDA associado à técnica de Cromatografia Gás-Líquido/Olfactometria (GCO) para identificar os compostos odoríferamente mais activos em extractos de sementes de cacau e de pasta de cacau, respectivamente.

Uma outra abordagem a este tipo de investigação pode ser feita através do conceito de "unidade de odor" (U_o) mas ainda não foi aplicada ao cacau. Baseia-se na relação entre a concentração de um dado composto e o respetivo limiar de detecção (LD), o que possibilita o cálculo do número de "unidades de odor" (U_o) com que esse composto contribui para o odor do produto (Teranishi *et al.*, 1971).

O objectivo deste trabalho é identificar e quantificar alguns compostos odoríferos principais em sementes de cacau comercial torradas, através de metodologia por nós afinada, por cálculo do respetivo número de U_o .

2. Material – Sementes de cacau comercial (fermentadas durante 136h e secas ao sol e em secador artificial "Tromag") provenientes de São Tomé e Príncipe.

3. Métodos - *Compostos voláteis*: Após torra e moenda, procedeu-se ao isolamento por destilação por arrastamento de vapor e à identificação e quantificação por Cromatografia Gás-Líquido (Almeida *et al.*, 1999); *Número de unidades de odor* (U_o) = c/LD , onde: c =concentração do composto no produto, LD=limiar de detecção do composto em água.

4. Resultados e discussão – No quadro seguinte apresenta-se o número de U_o dos compostos quantificados no extracto para os quais existem valores de LD publicados.

Da análise dos dados ressalta a importância de 3-metilbutanal, hexanal, trimetilpirazina, 2-etil-3,6-dimetilpirazina, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, fenilacetaldéido e benzaldeído, todos com valores de log ($n^o U_o$) superiores a 1, no odor das sementes de cacau comercial torradas.

Número de unidades de odor (U_o) de alguns compostos quantificados nas amostras torradas

Composto	IR ^a	LD (ppm) ^b	sol		"Tromag"	
			$n^o U_o$	log ($n^o U_o$)	$n^o U_o$	log ($n^o U_o$)
Diacetil	881	0,003	284,6	2,45	1234	3,1
3-Metilbutanal	910	0,0002	112930	5,05	67705	4,8
Hexanal	1075	0,0045	31,77	1,5	24	1,4
2-Metilpirazina	1247	60	0,005	-2,25	0,00255	-2,6
2,5-Dimetilpirazina	1300	1,75	0,386	-0,41	0,37	-0,43
2,6-Dimetilpirazina	1308	1,5	0,355	-0,45	0,27	-0,561
2-Etilpirazina+outro	1314	6,0	0,138	-0,86	0,136	-0,864
2,3-Dimetilpirazina	1233	2,5	0,198	-0,70	0,206	-0,685
2-Etil-5-metilpirazina	1363	0,1	4,32	0,64	2,04	0,309
2,3,5-Trimetilpirazina	1369	0,023	61,08	1,79	68,86	1,84
2-Etil-3,6-dimetilpirazina	1421	0,0086	105,46	2,02	76,74	1,89
2-Etil-3,5-dimetilpirazina	1437	0,00004	4875	3,69	6600	3,82
Benzaldeído	1493	0,35	22,4	1,35	5,2	0,72
Fenilacetaldéido+outro	1616	0,004	1899,5	3,28	1230,75	3,09
Álcool furfurílico	1653	1,9	0,977	-0,01	0,924	-0,03

^a IR=Índices de retenção calculados com a fase CP – Wax 52 CB.; ^b Limiar de detecção na água (Boelens e Gemert, 1995; Butterly e Ling, 1997; Butterly *et al.*, 1997).

Os resultados confirmam os obtidos, através da técnica GCO, por Chanliau (1995), Schnermann e Schieberle (1997) e por nós próprios em estudos preliminares (Almeida, 1998). O cálculo do número de U_o permitiu-nos assim, apesar das suas conhecidas limitações, superar alguns dos condicionalismos da GCO que impediram a utilização desta técnica no nosso laboratório.

Bibliografia

- ALMEIDA, M. H. G. (1998) – *Cacau. Tecnologia pós-colheita. A fracção volátil do "flavour"*, Dissert. Dout. Eng. Agro-industrial, Lisboa, ISA.
- ALMEIDA, M. H. G.; RODRIGUES, S. M. B.; LOURENÇO, M. G. (1999) - Determinação de compostos voláteis em cacau por Cromatografia Gás-Líquido. In: *Livro de actas do 4º Encontro de Química dos Alimentos*, Coimbra, Sociedade Portuguesa de Química e Universidade de Coimbra, 180-182.
- BOELENS, M. H. e GEMERT, L. J., van (1995) - Structure-activity relationships of natural volatile nitrogen compounds. *Perfumer & Flavorist*, 20 (5): 63-66, 68-72, 74-76.
- BUTTERLY, R. G.; LING, L. C. (1997) - 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine: odor thresholds in water solution. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30 (1): 109-110.
- BUTTERLY, R. G.; LING, L. C. e STERN, D. J. (1997) – Studies on popcorn aroma and flavor volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 837-843.
- CHANLIAU, S. (1995) - *Influence du traitement post-recolte et de la torrefaction sur le developpement de l'arome cacao. Essais préliminaires de caractérisation des composés odorants*, Diplome d'études approfondies, Montpellier, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- NIJSSEN, L.M.; VISSCHER, C.A.; MAARSE, H.; WILLEMSSENS, L.C. e BOELENS, M.H. (1996) – Cocoa. In: *Volatile compound in food. Qualitative and quantitative data*, Zeist, TNO Nutrition and Food Research Institute, 71.1-71.16.
- SCHNERMANN, P. e SCHIEBERLE, P. (1997) – Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3): 867-872.
- TERANISHI, R.; HORNSTEIN, I.; ISSENBERG, P. e WICK, E. L. (1971) – *Flavor research. Principles and Techniques*, New York, Marcel Dekker, Inc.

Agradecimentos

À Mantero-Agricultura e Comércio Internacional SA pelas facilidades proporcionadas durante o trabalho desenvolvido na EEA Bela Vista (São Tomé e Príncipe), onde foram colhidas as amostras de sementes de cacau.

**CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA/ELECTROFORESE CAPILAR**

P19. Online HPLC Chiroptical Detection of 2-Hydroxyglutaric Acid Enantiomers and Diagnostic of 2-Hydroxyglutaric Acidurias

H. J. Chaves das Neves, M.D.R. Gomes da Silva, M. M. P. Gonçalves, and M. R. Tojeiro, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2827-114 Monte da Caparica. K. Andert, IABW eV, Robert-Roessle Strasse 10, D-13125 Berlin, Germany

L-2-Hydroxyglutaric aciduria is a rare metabolic disease with a neurological presentation but new cases keep appearing regularly. Diagnostic relies heavily upon the determination of the absolute configuration of 2-hydroxyglutaric in the urinary organic acids' profile. The same applies for the D enantiomer, since D-2-hydroxyglutaric aciduria is a different disease. Until now analytical diagnostic of such cases is based on the preparation adequate diasteromeric derivatives for gas chromatography or liquid chromatography but the derivatisation procedures may have some detrimental effects in the analysis, principally if quantitative data are required or are less adequate for the daily routine work. 2-Hydroxyglutaric acid is very prone to lactonisation. Even very mild reaction conditions may lead to appreciable lactone formation. This tendency is enhanced under acidic reaction conditions and with temperature. Other possible side reactions in acidic media are solvolysis and partial racemisation. The presence of extraneous peaks in samples may arise from these side reactions. Recoveries of 77% can be achieved in urine samples with a coefficient of variation of 5.5%. Chiral resolution of both enantiomers of racemic disodium 2-hydroxyglutarate is achieved on a commercial HPLC column, where the macrocyclic antibiotic Teicoplanin, chemically bonded to a silica gel bed is used as chiral selector, under ELSD monitoring. Since elution is carried out at pH 4, with triethylammonium acetate buffer, the free acids are released with the formation of unretained sodium acetate that is detected by the evaporative light-scattering detector. Although enantiomer identification and quantitation can still be achieved, a cleaner chromatogram is obtained by elimination of sodium acetate by treatment of the sample with a strong cationic ion-exchanger resin (Figure 1).

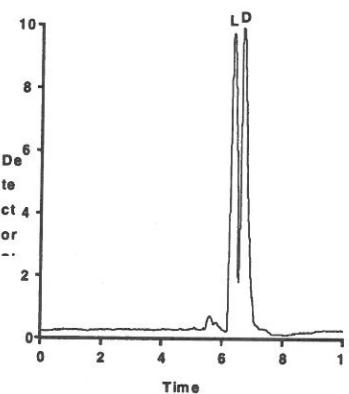


Figure 1.

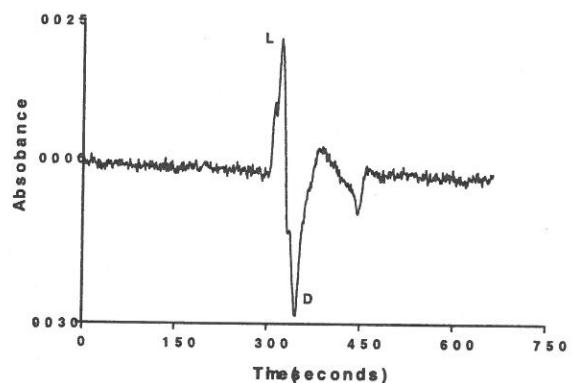
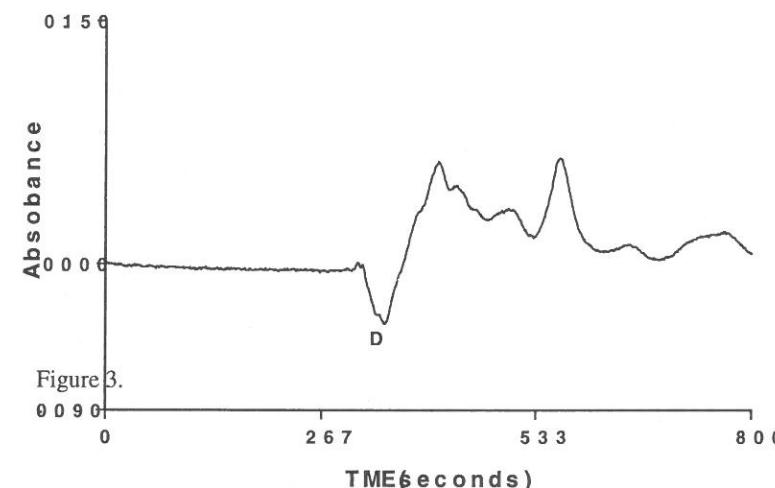


Figure 2.

Online chiroptical detection is achieved by a in-house constructed CD detector still at prototype stage. Under CD detection conditions or polarized light conditions the enantiomers originate positive (L) or negative (D) signals relative to the base line (Figure 2). This type of chiroptical spectroscopic detection allows direct configuration assignment by direct observation of the chromatogram together with the corresponding polarized light absorbance or/and the CD spectra.

Figure 3 shows the potential application to direct diagnostic of 2-hydroxyglutaric acidurias. The chiroptical HPLC assay of a simulated patient's urine shows a negative sign corresponding to the presence of D-2-hydroxyglutaric acid.



Acknowledgements

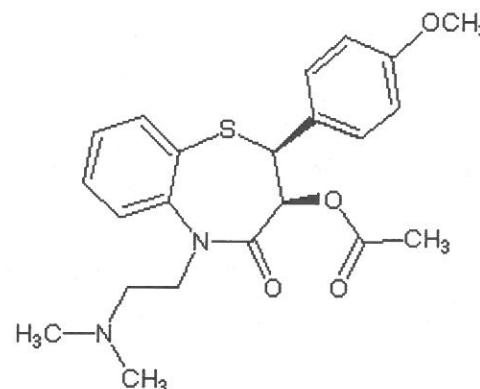
Financial support under EU contract MAT1-CT-930043 is gratefully acknowledged

P20. Online HPLC Chiroptical Detection of Active Pharmaceutical Enantiomers and Enantiomeric Purity Determination without Chiral Separation

H. J. Chaves das Neves, M.D.R. Gomes da Silva, M. M. P. Gonçalves, and M. R. Tojeiro, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2827-114 Monte da Caparica. K. Andert, IABW eV, Robert-Roessle Strasse 10, D-13125 Berlin, Germany

Diltiazem is the commercial name of (2*S*-*cis*)-3-(acetoxy)-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-one; (+)-*cis*-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,3-dihydro-3-hydroxy-2-(*p*-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-one acetate (*I*).

(*I*)



It is pharmaceutically active as a calcium antagonist used in the treatment of variant angina, with antiarrhythmic and antihypertensive effects. A number of methods for the chromatographic assay of Diltiazem have been published in the last 20 years, involving gas chromatography (HRGC), thin layer chromatography and HPLC. Once only the *S*-*cis* form is active, methods for assessing enantiomer purity have become mandatory in the last few years. Recently CZE methods have been recommended for enantiomer separation, but associated stability problems may complicate the unequivocal assignment of the peaks in real samples of pharmaceutical or physiological origin.

We have been developing a new spectroscopic detector for online HPLC chiroptical detection by UV and CD spectroscopy. The present results show the potential application of the new instrument, still at prototype phase, in the resolution of chiral chromatographic detection. Figure 1 shows the detector output in UV and CD modes for a batch of the raw drug analysed by HPLC on a Chirobiotic T™ column. Both enantiomers are recognised, chromatographically as well as spectroscopically.

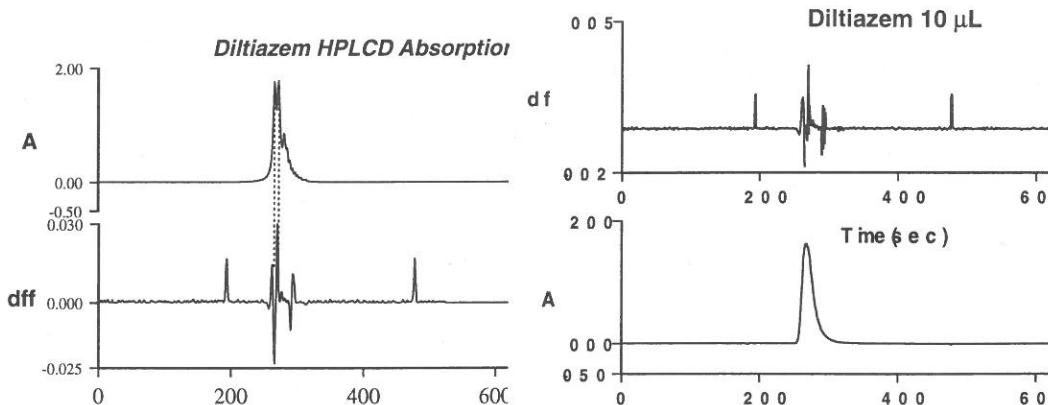


Figure 1

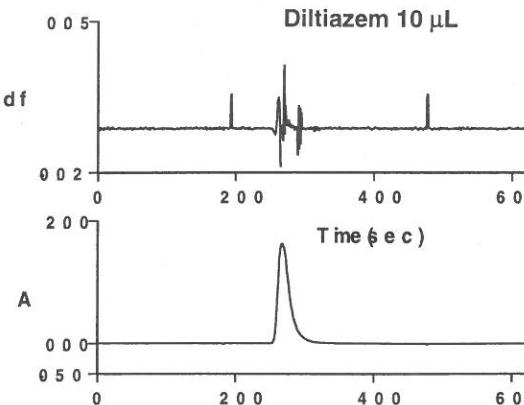


Figure 2

The importance of this new online chiroptical detection is the ability to deconvolute incomplete enantiomeric separations, as shown in Figure 2. The detector in CD mode allows assessment of enantiomeric purity without enantiomer separation. Complementary identification can be achieved by means of both UV and CD spectra (Figure 3).

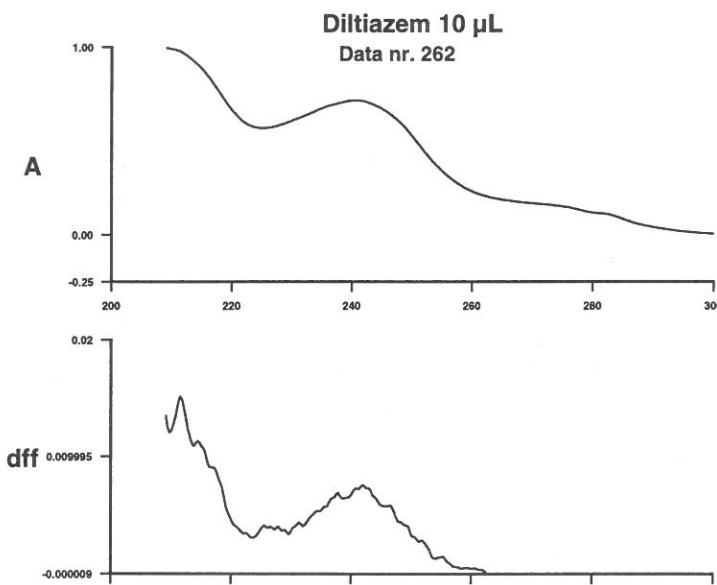


Figure 3

Acknowledgements

Financial support under EU contract MAT1-CT-930043 is gratefully acknowledged.

P21. Síntese e Separação de Estereoisómeros de Kielcorinas

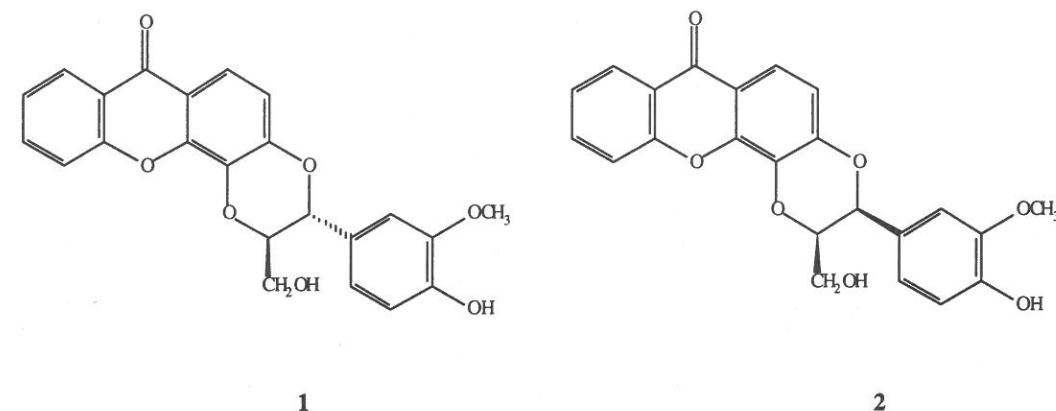
Carlos M. M. Afonso^a, M. Emília Sousa^{a,b}, Madalena M.M.Pinto^a

(a)C.E.Q.O.F.F.U.P.; Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha, 164
4050-047, Porto, Portugal

(b)I.S.C.S. - Norte, Rua Central da Gandra, 1317, 4580 Gandra

As kielcorinas são derivados 1,4-benzodioxânicos, pertencentes à classe dos xantonolignóides, que mostram interessante actividade biológica [1,2].

O processo de obtenção das kielcorinas é baseado no acoplamento oxidativo de um núcleo xantónico com o álcool coníferílico [3]. Tendo como blocos construtores a 3,4-diidroxiantona e o álcool coníferílico foram obtidas a *trans*-(±)-kielcorina C (1) e a *cis*-(±)-kielcorina C (2) no produto bruto da reacção [4].



A *trans*-(±)-kielcorina C (1) e a *cis*-(±)-kielcorina C (2) demonstraram actividade promissora em estudos de citotoxicidade e proliferação de linfócitos-T humanos, *in vitro* [5].

Os isómeros *cis/trans* foram separados por RP-HPLC, utilizando como fase móvel metanol/água (20:80).

Neste trabalho são descritos os processos de síntese e separações cromatográficas efectuadas.

Referências

- [1] E. R. Fernandes, F. D. Carvalho, F. G. Remião, M. L. Bastos, M. M. Pinto, e O. R. Gottlieb, *Pharm. Res.*, 1995, 12, 1756-1760.
- [2] A. Abou-Shoer, A. Habib, C. Chang, J. M. Cassady, *Phytochemistry*, 1989, 28, 2483-2487.

- [3] E. R. Fernandes, M. M. Pinto, A. M. S. Silva, J. A. S. Cavaleiro e O. R. Gottlieb, *Heterocycles*, 1999, 51 (4), 821-828.
- [4] M. M. M. Pinto e M. E. S. P. Sousa, "Xanthonolignoids: Total Synthesis", 8th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, São Pedro (São Paulo), Brasil, 7-11 Setembro, 1998.
- [5] M. M. M. Pinto, M. S. J. Nascimento, M. E. S. P. Sousa, M. Pedro e F. Cerqueira "Effect of 3,4-dihydroxyxanthone and kiekcorin derivatives against human cancer cell lines and human T-lymphocyte proliferation", 17th International Congress of Heterocyclic Chemistry, Viena, Áustria, 1-6 Agosto, 1999

Agradecimentos

À Fundação para a Ciéncia e Tecnologia (Praxis XXI, FEDER), Unidade de I&D nº226/94, Projecto Praxis XXI (2/2.1/QUI/17/94) pelo apoio financeiro e Praxis XXI(BD/15663/98) por uma bolsa de estudo a Maria Emilia S. P. Sousa.

P22. Development and Full ICH Validation of a Direct HPLC Method for the Quality Control of a Pharmaceutical Dosage form Containing Phenol and Salicylic Acid

R. Manadas, F. Veiga, J. J. Sousa, M. E. Pina

Laboratório de Tecnologia Farmacéutica (Unidade de Controlo de Qualidade de Medicamentos) Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

Salicylic acid (SA) associated to Phenol (PHE) is being used to treat some skin diseases caused by a vegetable parasite called *Trichophyton tonsurans*. These substances are present in a pharmaceutical dosage form commercially available in Portugal as a lotion.

At the moment there are few chromatographic methods for the determination of these two components. Those methods referred in the literature have been developed to determine salicylic acid and its related substances - phenol, 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxyisophthalic acid-, which are present in small amounts. They are time consuming, the peaks are often not well resolved or have not good shapes, and use expensive chromatographic columns.

The method developed was optimised aiming the fastest run time without compromising the resolution of the peaks in the drug product (drug substances, impurities and excipients).

The validation of the method complies with the latest ICH (International Conference Harmonisation) recommendations for the analytical method validation procedure.

We have performed the specificity tests (including the identification, the assay and impurity test), the linearity, the range (according to the working concentrations), the accuracy (concerning the drug substance and the drug product), the precision (repeatability and intermediate precision) and some parameters of the robustness test (temperature, pH and flow rate).

The chromatographic system consisted of a solvent-delivery pump (Shimadzu LC-10AD) equipped with a variable dual wavelength SPD-10Avvp UV/Vis detector, a quaternary FCV-10AL solvent delivery system, and an injector with a 20 μ l loop. Data were recorded and analysed in a Pentium 11 computer by the LC-Workstation (Class LC-10Version 1) interfaced with Shimadzu's CBM- 10A Communications Bus Module. The column used was a Chrompack 250 x 4.6 mm i.d. Spherisorb 10 ODS at room temperature. The mobile phase consisted of a methanol/water mixture adjusted to pH 3 with acetic acid glacial. The flow rate was set at 1 ml/min and the detector at 270 nm.

Standards and samples were dissolved in the mobile phase and diluted to the appropriate concentration prior to injection.

Identification of the raw materials was performed by comparison of its chromatograms with those of the standard materials (USP RSMs) after injection of the solutions on the system. The impurities of salicylic acid (4-hydroxybenzoic acid -4HBA, and 4-hydroxyisophthalic acid -4-HIPA), which are commercially available, were identified using the same method.

Linearity was studied in the range of 5-30 μ g/ml for PHE and 10-60 μ g/ml for SA and good correlation coefficients were achieved when the calibration curve was plotted.

The accuracy has been established across the range for linearity of the analytical procedure. It has been studied in the drug substance by comparison of the results obtained from the standards with those of the drug product, by application of the analytical procedure to a synthetic mixture of the drug product components. The synthetic mixture has been prepared with the excipients to which known quantities of the drug substances have been added. We studied two parameters of the precision: repeatability and intermediate precision. The achieved repeatability, expressed as the coefficient of variation (RSD), was always lower than 0.5% (RSD). Intermediate precision, expressing within-laboratories variations in different days, was always lower than 1% (RSD).

Robustness has also been studied through the variation of temperature, pH and flow rate.

We reached a time saving, precise and accurate method for the determination of these substances in the studied dosage form, with separation, identification and quantification of the related substances of salicylic acid - other than phenol - that can be used in other matrices (pharmaceutical or biological).

P23. HPLC Development and Validation of a Direct Method for Simultaneous Determination of a Pyrethroid Insecticide and One of its Synergists in a Pharmaceutical Dosage Form

R. Manadas, F. VEIGA, J. J. Sousa, M. E. Pina

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Unidade de Controlo de Qualidade de Medicamentos) Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

Permethrin (PER) is an important type 11 pyrethroid insecticide with worldwide use in veterinary medicine, agriculture, forestry, household, store products, public health and in human preparations as insecticide or as repellent. It is active against a wide range of pests including lice, ticks, fleas, mosquitoes, and black flies. Piperonyl butoxide (PBO) is a synthetic methylenedioxypyphenyl inhibitor of cytochrome(s):P450, and is an important synergist in several insecticide formulations.

There are several methods for the determination of each of these products alone. However, a few processes determine both components and none is adequate for simultaneous quantification of them and of the two isomers of Permethrin.

We used a PER standard containing 22.3% of the cis-isomer and 77.7% of its trans-isomer and PBO for the development of the method and the elaboration of the calibration curve and a sample of shampoo containing 1% of PER and 2% of PBO that is used against pediculosis capititis in humans. Other reagents were HPLC grade and purchased to Merck.

The chromatographic system consisted of a solvent-delivery pump (Shimadzu LC-10AD) equipped with a variable dual wavelength SPD-10Avvp UV/Vis detector, a quaternary FCV-10AL solvent delivery system, and an injector with 20 μ l loop. Data were recorded and analysed in a Pentium II computer by the LC-Workstation (Class LC-10 Version 1) interfaced with Shimadzu's CBM- 10A communications bus module. We used a RP-8 Lichrosorb (250 x 4.6 mm i.d.) 5 μ m (Jones Chromatography) column at room temperature (20-23° C). The detector was set at two wavelengths: 201nm for quantification of PER and 287nm for quantification of PBO. Analyses were carried out isocratically using a three-component mobile phase: acetonitrile:methanol:water.

Standards and sample were accurately weighed, dissolved in the mobile phase, diluted to the appropriate concentration filtered and injected in the chromatographic system without any previous sample preparation. We tested the selectivity, precision, intermediate precision, linearity and accuracy of the method obtaining excellent results.

The method was optimised varying the mobile phase composition until obtaining a final run time of 15 minutes and a resolution of approximately 2 between the two isomers of PER.

Precision varied from 0.31%, 1.07% to 2.70% (Mean RSD) for PBO, Trans-PER and Cis-PER, respectively. The linearity of the method was verified under the range of concentrations of 4- 25 μ g/ml for PBO, 1.554-9.713 μ g/ml for Trans-PER and 0.456-2.788 μ g/ml for Cis- PER.

The calibration curve was calculated using five points and good correlation coefficients were obtained for the three components: $R^2=0.9997$ for PBO, $R^2=0.9999$ for Trans-PER and $R^2=0.9999$ for cis-PER.

After this work it was demonstrated that the procedure developed is simple, sensitive, precise and accurate. According to the validation parameters, we can conclude that this is a rapid method for the routine control of cis and trans-PER and PBO present in a shampoo formulation and may be further studied for the application in other pharmaceutical matrices.

P24. Avaliação Intralaboratorial de um Método de Quantificação dos ácidos Gállico, Vanílico, Siríngico, Ferúlico e Elágico por HPLC em Aguardentes Envelhecidas

Canas,S.^{1,2}; Costa, S.^{1,3}; Carvalho, E.C.¹; Spranger, M.I.¹; Belchior, A.P.¹

¹ Estação Vitivinícola Nacional – INIA. Quinta d'Almoinha. 2560 Dois Portos

² Bolsa de Doutoramento da FCT (PRAXIS XXI)

³ Aquisição de serviços

Os ácidos fenólicos, designadamente os ácidos gállico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico, são constituintes da madeira usada no fabrico de quartolas, bem como das aguardentes e vinhos, pela transferência ocorrida durante o processo de envelhecimento em madeira (Delgado e Gómez-Cordovés, 1987; Chatonnet, 1995; Martinez *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996; Canas *et al.*, 1998a; Canas *et al.*, 1999) e ocupam uma posição de destaque, ao nível dos compostos fenólicos de baixo peso molecular. Tal importância reveste-se de um carácter tanto quantitativo, como qualitativo, sendo de realçar o aporte da madeira para a presença de alguns destes ácidos. Sob este aspecto a madeira coloca-se como outro elemento que poderá contribuir para sustentar os efeitos benéficos para a saúde associados a um consumo moderado de vinho (Ribeiro de Lima *et al.*, 1998). As observações anteriores têm pois implícito o interesse da determinação rigorosa dos teores dos ácidos fenólicos nas madeiras, nos vinhos e nas aguardentes envelhecidas. Nesta constatação assentou o objectivo do presente trabalho: a avaliação intralaboratorial de um método de quantificação dos ácidos gállico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico, por HPLC, em aguardentes envelhecidas.

Descrição do método: Após filtração por membrana de 0,45 μ m (Titan), as amostras foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

- Solventes: A - água/ácido fórmico (98:2 v/v); B - metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v);
- perfil de eluição - adaptado de Puech *et al.* (1988): regime isocrático 0% B em 3 min., seguido de gradientes lineares de 0 a 40% B em 22 min.; de 40 a 60 % B em 18 min., regime isocrático com 60 % B em 12 min., gradiente linear de 60 a 80 % B em 5 min.; regime isocrático 80 % B em 5 min.

- volume de injeção - 20 μ l; fluxo - 1 ml.min⁻¹; λ - 280 nm; temp. da coluna - 40 °C.

Equipamento: Lachrom Merck Hitachi equipado com bomba quaternária L-7100, detector UV-Vis L-7400 e injector automático L-7250. Coluna Lichrospher RP18 (5 μ m), Merck, de 250 mm x 4 mm. Aquisição e tratamento de dados: Millennium 2010.

Reagentes e padrões: Solventes *gradient grade* (Merck) e padrões - ácido gállico monohidratado, ácido elágico dihidratado, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido ferúlico - (Fluka).

Avaliação intralaboratorial do método: Os parâmetros relativos à praticabilidade, especificidade, quantificação e fidelidade foram estudados com base no protocolo de Monteiro e Bertrand (1994). Para a determinação dos limiares analíticos adoptou-se o procedimento proposto por Caporal-Gautier *et al.* (1992). No Quadro 1 são apresentados alguns dos parâmetros analisados.

Quadro 1 - Alguns parâmetros de avaliação intralaboratorial do método

Composto	Eq. curva calibraçao	Gama conc. (mg/l)	Coef. Corr.	Limiar detecção (mg/l)	Limiar quant. (mg/l)	Sensib. (V*sec/mg.l ⁻¹)	Repetib. (mg/l)	
							A	B
ác. gálico	y=38422x	0 a 200	0,9996	0,372	1,239	0,0384	3,873	2,638
ác. vanílico	y=23281x	0 a 20	0,9998	0,266	0,885	0,0244	0,442	0,203
ác. siríngico	y=42544x	0 a 25	0,9999	0,041	0,136	0,0394	0,498	0,468
ác. ferúlico	y=24405x	0 a 19	0,9999	0,039	0,131	0,0532	0,814	0,325
ác. elágico	y=20398x	0 a 250	0,9984	0,790	2,632	0,2252	3,163	1,395

y - área; x - conc. ; A,B = diferentes amostras de aguardentes usadas para o cálculo da repetibilidade.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método desenvolvido é, de facto, adequado ao objectivo definido.

Referências

- Canas, S; Leandro, M.C.; Spranger, M.I.; Belchior, A.P. (1998 a). *4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, Vol. 2, 223-229.
 Canas, S; Caldeira, I.; Spranger, M.I.; Clímaco, M.C.; Belchior, A.P. (1998b). *XIXth International Conference on Polyphenols*, Vol. 2, 373-374.
 Canas, S. Leandro, M.C.; Spranger, M.I.; Belchior, A.P. (1999). *Holzforschung* (no prelo).
 Caporal-Gautier *et al.* (1992) citado por Tusseau, D. (1996). Feuillet vert OIV 1000.
 Chatonnet, P. (1995). Thèse Doctorat. Université de Bordeaux. 268 pp.
 Delgado, T.; Gómez-Cordovés, C.(1987). *Revue Fr. Oenol.*, 107, 39- 43.
 Martinez, R.G.; Serrana, H.L.G., Mir, M.V.; Granados, J.Q.; Martinez, M.C.L. (1996). *Am.J.Enol.Vitic.*, 47, 441-446.
 Monteiro, M.J.P.; Bertrand, A. (1994). Feuillet vert OIV 970.
 Ribeiro de Lima, M.T.; Teissedre, P.L.; Cabanis, J.C. (1998). *XXIII Congresso Mundial da Vinha e do Vinho*, Vol. II, 34-40.
 Simon, B.F.; Conde, E., Cadahia, E.; Garcia-Vallejo, M.C. (1996). *J. Sci. Tech. Tonellerie*, 2, 1-11.

P25. Análise de Licores Tradicionais do Algarve: HPLC e electroforese capilar

Mário C. Patrício¹, Ana C. Martins¹, M.Rosário Bronze^{1,2}, V. R. Almeida³, L. R. Galego³, L. Vilas Boas^{1,4}

¹ Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

² Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

³ EST da Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8000 Faro

⁴ Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

INTRODUÇÃO

A produção de licores no Algarve tem particular importância por utilizar produtos que habitualmente são excedentários na região. A sua preparação envolve a maceração de frutos ou plantas em aguardente de figo, seguido da adição de um xarope de açúcar.

Neste tipo de bebidas são muito importantes os compostos responsáveis pelas características aromáticas, assim como os que lhes conferem sabores e cores características.

A electroforese capilar (EC) tem sido utilizada na análise de compostos fenólicos em bebidas alcoólicas [1] (vinhos brancos e tintos, licorosos, aguardentes vínicas), extractos alcoólicos de madeira [1] e de frutas (tangerina) [2].

Neste trabalho, pretendeu-se mostrar a aplicabilidade da técnica de EC na análise dos licores obtidos a partir de vários citrinos (laranja, tangerina e limão) e que contribuem assim para a composição química e características organolépticas destas bebidas. Os resultados das análises foram comparados com os obtidos na análise por HPLC com detecção espectrofotométrica.

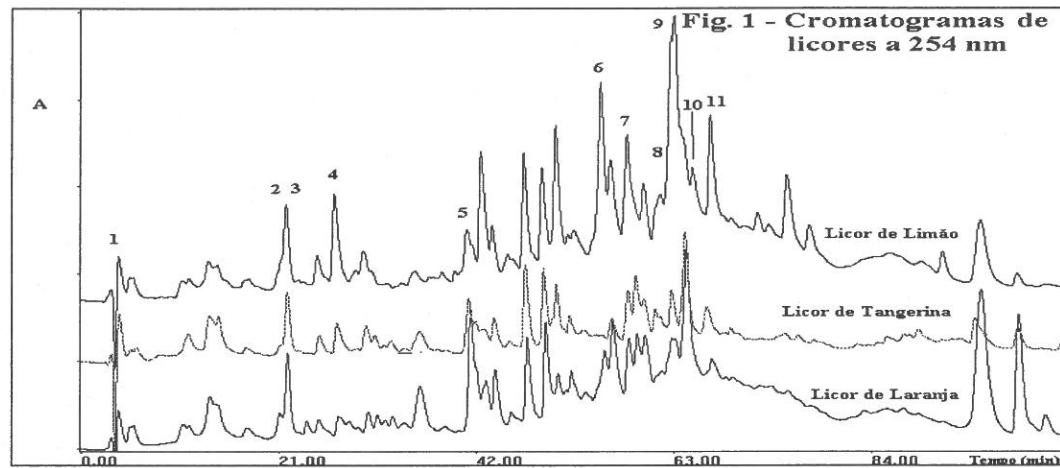
EXPERIMENTAL

Os licores de limão, tangerina e laranja, foram analisados por electroforese capilar (Lauerlabs, Prince) com detecção UV a 254 nm. A separação, em solução tampão 10 mM de borato a pH=9.2, ocorreu a 35°C, a potencial de 25 kV.

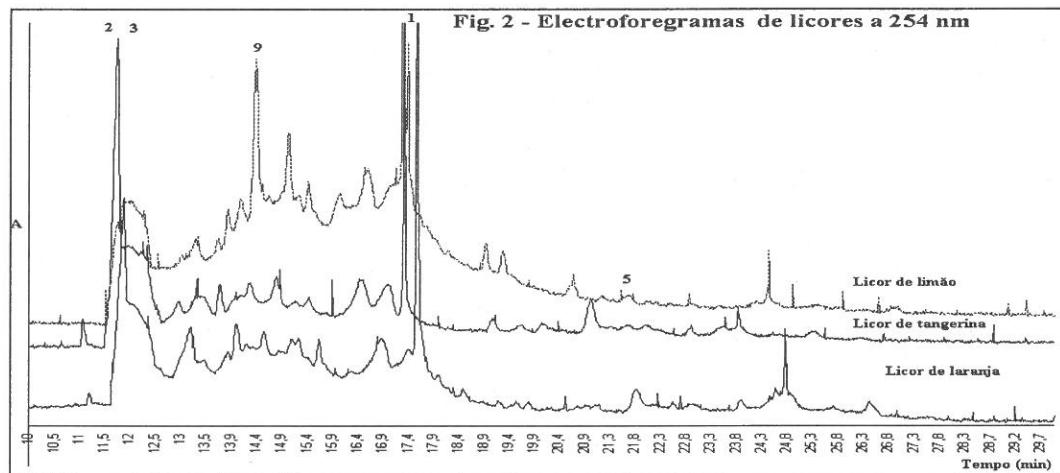
As amostras também foram analisadas por HPLC num equipamento UNICAM com detector de diódos. Foi utilizada uma coluna Lichrospher RP-18, 5 µm (Merck). Foram utilizados os seguintes eluentes: A-ác. fosfórico 0.1% B-ác. fosfórico 0.1%, acetonitrilo 40%, água 60% com a seguinte programação de eluentes: 0-15 min até 20% B; 15-25 min com 20% B; 25-70 min até 70% B; 70-75 min com 70% B; 75-85 min até 100% B; 85-90 min com 100% B. O fluxo era de 0.7 ml/min e a temperatura da coluna 35°C. A identificação dos compostos foi feita por sobrecarga da amostra com soluções dos seguintes padrões: ácido ascórbico (1), furfural (2), ácido cítrico (3), ác. 3-hidroxibenzoíco (4), ác. 2-furóico (5), ác. ferúlico (6), 2-vanilina (7), rutina (8), naringina (9), hesperidina (10), miricetina (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de se fazer uma comparação dos diferentes licores, apresentam-se na figura 1 os perfis cromatográficos obtidos nas análises de licores de limão, laranja e tangerina.



Os perfis electroforéticos dos mesmos licores são comparados na figura 2. Os resultados obtidos mostram que os perfis cromatográficos e electroforéticos dos licores de tangerina e laranja são muito semelhantes.



Relativamente ao licor de limão já se notam algumas diferenças no perfil desta amostra, nomeadamente a concentração de hesperidina (figura 1) é inferior e a concentração de naringina é superior.

Os resultados obtidos mostram a aplicabilidade das técnicas de EC e HPLC na análise deste tipo de amostras e discutem-se as vantagens e desvantagens das duas técnicas relacionadas com o tempo de análise e volume de reagentes e de amostra utilizados.

Referências

- [1] M. Rosário Bronze, L. F. Vilas Boas, *Analisis*, 26, 40-47, 1998.
- [2] Mário C. Patrício, Tese de Licenciatura, Faculdade de Ciências de Lisboa, 1999.

P26. Análise de Vinhos Moscatel por HPLC com Detecção Espectrofotométrica e Electroquímica

M. Nubélia Matos^{1,2}, M. Rosário Bronze^{1,2}, Luís Vilas Boas^{2,3}

¹ Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

² Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

³ Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

INTRODUÇÃO

Os compostos presentes nos vinhos licorosos, provêm das uvas e também das madeiras usadas durante o período de estágio. Na caracterização de vinhos Moscatel estão a ser utilizadas técnicas de cromatografia em fase gasosa no estudo de componentes voláteis.

Os componentes não voláteis presentes nestes vinhos, designadamente os compostos fenólicos, são habitualmente analisados por técnicas separativas (cromatografia em fase líquida e electroforese capilar) associadas a detectores de absorção no ultravioleta e em alguns casos de fluorescência [1]. Dada a possibilidade de muitos destes compostos sofrerem reacções de oxiredução, a detecção electroquímica pode funcionar como uma ferramenta importante que vai contribuir para um conhecimento mais aprofundado da composição química e propriedades dos compostos existentes nessas amostras.

Neste trabalho, apresentam-se resultados preliminares obtidos no estudo de compostos fenólicos existentes em vinhos licorosos Moscatel de diferentes proveniências e em diferentes fases de processamento, mediante análises por HPLC utilizando detectores de absorção (UV-vis) e electroquímico colocados em série.

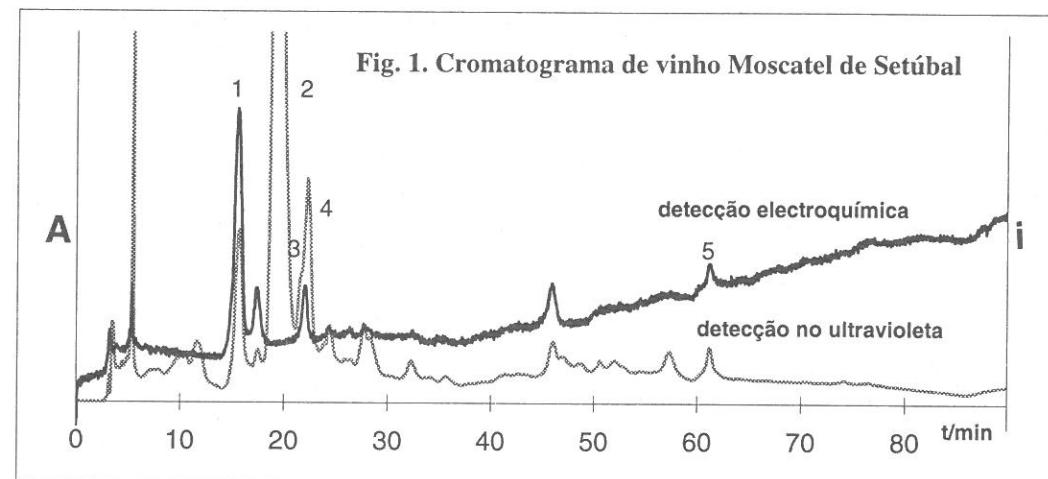
EXPERIMENTAL

Amostras de vinhos licorosos Moscatel adquiridos no mercado bem como de um vinho de 1999 que está em fase de produção foram filtradas em membrana de 0.45µm antes de injectar no cromatógrafo, usando condições de análise descritas anteriormente [1]. Para confirmar a identificação de alguns compostos usaram-se soluções de padrões.

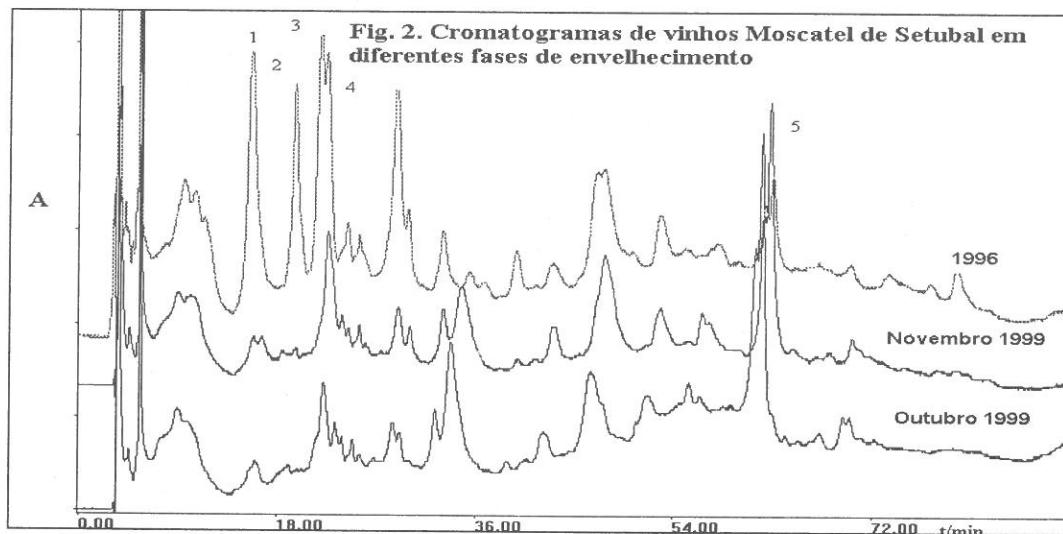
O cromatógrafo estava equipado com detectores de diódos e electroquímico ligados em série, sendo o tratamento de dados do detector electroquímico feito de acordo com o procedimento descrito em outra comunicação [2].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os chromatograms apresentados na figura 1 pretendem ilustrar o perfil cromatográfico duma amostra de vinho velho Moscatel de Setúbal de 1955, e comparando os dois modos de detecção evidencia-se que apenas alguns dos compostos responsáveis pelos picos detectados por absorção no ultravioleta são electroquimicamente activos. A identificação de alguns compostos foi feita por sobrecarga com padrões (tais como ácido gálico (1), 5-HMF (2), furfural (3), ácido protocatechuíco (4) e o ácido elágico (5)).



Para ilustrar a evolução de composição química do vinho Moscatel, apresentam-se na figura 2 os cromatogramas de um vinho em início de produção e um vinho com 3 anos.



Os resultados preliminares obtidos no trabalho que estamos a realizar serão discutidos comparando os cromatogramas obtidos pelos dois modos de detecção a fim de estudar a evolução que se observa nestes vinhos ao longo do período de envelhecimento.

AGRADECIMENTO – À empresa José Maria da Fonseca pela cedência das amostras.

REFERÊNCIAS

- [1] M. R. Bronze, Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia de Lisboa, 1998.
- [2] Rui Lopes Marques, Mário C. Patrício, Luís Vilas Boas, Comunicação ao 1º Encontro Nacional de Cromatografia, Lisboa, 1999.

P27. Novo Método de Análise de Carbamato de Etilo em Vinhos por HPLC com Detecção Fluorimétrica

P. Herbert*, L. Santos*, M. Bastos**, P. Barros*** e A. Alves*

*LEPÆ - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia do Porto

** DEQ - FEUP

*** Instituto do Vinho do Porto

Introdução: O carbamato de etilo (CE) é um composto com actividade carcinogénica, presente em quantidades vestigiais em alguns vinhos. A necessidade de cumprimento da legislação referente ao estabelecimento de limites máximos de CE em vinhos, bem como o desconhecimento actual dos níveis deste componente nos vinhos de qualidade portugueses, motivou o estudo de uma metodologia fiável e ao mesmo tempo capaz de ser implementada em laboratórios de controlo de qualidade.

Foi desenvolvido um procedimento analítico para a quantificação de carbamato de etilo em vinhos, através de uma derivatização pré-coluna com 9-xantidrol e posterior separação e detecção do derivado por HPLC com detector de fluorescência.

Material e Métodos: A derivatização pré-coluna envolve a reacção de 9-xantidrol com 500 μ l de amostra, em meio ácido, à temperatura ambiente, durante 5 minutos ao abrigo da luz. O derivado fluorescente é imediatamente injectado num sistema cromatográfico constituído por um cromatógrafo Hewlett Packard 1090 AminoQuant Series II, um detector Hewlett Packard 1046, tudo controlado por uma ChemStation HP (A06 revision). A separação cromatográfica efectuou-se numa coluna Coluna HP AminoQuant 200 x 2,1 mm 5 μ m, associada a uma pré-coluna HP ODS Hypersil 5 μ m 20 x 2,1 mm. O volume injectado foi de 15 μ L. A fase móvel A era constituída por tampão acetato de sódio 20mM pH 7,2 e a fase móvel B por acetonitrilo, utilizando-se um sistema de eluição gradiente. A detecção efectuou-se aos comprimentos de onda de excitação de 233 nm e de emissão de 600 nm.

Foram analisadas 42 amostras distribuídas por: Vinho da Madeira (12), Vinho do Porto (9), aguardentes vínicas (13) e de Vinho do Alentejo (8).

Resultados e Discussão: A metodologia analítica é suficientemente rápida para poder ser implementada em análises de rotina, onde o ponto crítico é frequentemente o elevado número de amostras a serem analisadas. As características principais do método são: separação cromatográfica em cerca de 30 minutos, limite de detecção de 4,2 μ g/L, precisão intermédia para as amostras de 6,3% e recuperação média de 96%.

O presente método não requer extração prévia das amostras, efectuando-se apenas uma diluição antes do procedimento de derivatização que demora 5 minutos.

Este método é compatível com as exigências da legislação, relativamente à qual os limites máximos de CE são 150 μ g/L para aguardentes, 100 μ g/L para vinhos licorosos e 50 μ g/L para vinhos de mesa.

Os valores médios de carbamato de etilo obtidos para cada grupo de vinhos estudados foram (média \pm desvio padrão): $91,2 \pm 47,9 \mu\text{g/L}$ (aguardentes), $31,9 \pm 21,2 \mu\text{g/L}$ (Vinho do Porto), abaixo do limite de quantificação (Vinhos do Alentejo) e $33,5 \pm 14,5 \mu\text{g/L}$ (Vinho da Madeira).

Agradecimentos: os autores agradecem ao Instituto do Vinho do Porto pela disponibilização do equipamento analítico que permitiu as determinações cromatográficas, bem como à Fundação da Ciéncia e tecnologia pelo financiamento do projecto PRAXIS 3/3.2/AGR/2307/95 e Bolsa de Doutoramento PRAXIS/BD 3261/96.

P28. Azeitonas de Mesa da cv ‘Galega’: Estudo Cromatográfico de Salmouras de Fermentação

Silva S.¹; Gomes, M.L.^{1,2}; Peres, C.^{1,3}

1-Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET)/ITQB Apt. 127, 2780 Oeiras2-Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Forças Armadas, 1600 Lisboa3-Estação Agronómica Nacional/INIA, Qta. do Marquês, 2780 Oeiras

1. – INTRODUÇÃO

Foram iniciados estudos sobre a azeitona de mesa da cultivar ‘Galega’ [1], devido à importância económica que reveste e à necessidade de implementação da sua ‘Denominação de Origem’.

A preparação de azeitona de mesa envolve uma fase de fermentação que decorre em salmouras e pela qual é responsável, em grande parte, flora láctica. Tornou-se pois necessário estabelecer meios que possibilitem o controlo e acompanhamento das transformações químicas, bioquímicas e biológicas que vão ocorrendo ao longo da fermentação de forma a conseguir um produto final de elevada qualidade e mantendo as suas características. Assim, têm sido estudados processamentos de azeitonas desta variedade, analisando quer os frutos, antes e depois de fermentados, quer as salmouras de fermentação em diferentes fases [2].

Neste trabalho, e referente à campanha de 1998, são descritos os métodos utilizados e os resultados conseguidos na análise de salmouras de fermentação de dois processos fermentativos, um de carácter artesanal outro semi-industrial.

2. – MATERIAL E MÉTODOS

Foram ensaiadas salmouras de azeitonas da cultivar ‘Galega’, colhidas ao longo do processo de fermentação, originárias de um produtor artesanal (Ladoeiro) – A e de um produtor semi-industrial (Envendos, Probeira) – B.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector “diode array” e com programas diferentes, foi usada para pesquisa de compostos frequentes em salmouras (oleuropeína, luteolina, luteolina-7-glucosídeo, rutina) e para a obtenção de perfis cromatográficos de compostos fenólicos; foi utilizada detecção electroquímica amperométrica para pesquisa de substâncias antioxidantes. O teor de polifenóis totais foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular.

A análise de componentes voláteis foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), sendo a microextracção em fase sólida (SPME) usada para a preparação da amostra.

3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras estudadas, apenas duas da produção B, e em fase final de fermentação, apresentaram um pico cromatográfico cujo espectro de absorção no UV se assemelhava ao da oleuropeína.

Relativamente aos perfis cromatográficos de compostos fenólicos, verificou-se marcadas diferenças entre os dois processamentos, exemplificados na figura 1. Observa-se que na fase inicial de fermentação os componentes voláteis detectados nas amostras A são diferentes dos de B, com exceção do ácido acético que é

o único composto comum. Para o processamento A verifica-se teores mais elevados destes componentes que para o B.

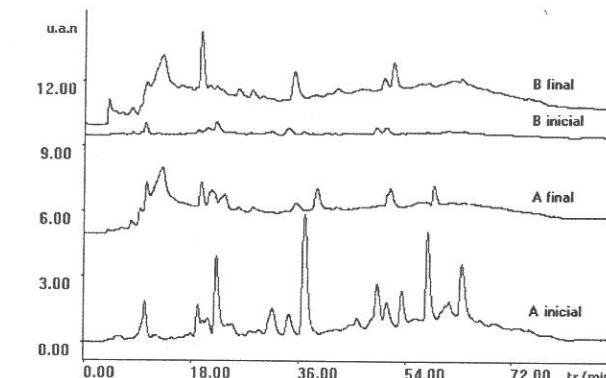


Figura 1.-Perfis cromatográficos de salmouras em diferentes estados de fermentação

Em final de fermentação a amostra do produtor B apresenta um maior número de compostos voláteis que a do A. Neste estado de fermentação os compostos identificados nas amostras A e B são maioritariamente pertencentes aos grupos dos ácidos e álcoois orgânicos sendo comuns aos dois processos: ácido acético, butirolactona, álcool feniletílico e 3-etil-fenol.

4. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Leitão, F.; Potes, M. F.; Calado, M. L.; Almeida, F. J. 1986. “Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal”. Min. da Agricultura. Dir. Geral de Plan. e Agr., Lisboa. 111 pp.
- 2- Peres, C. Brito; D. Oliveira, M. M.; Catulo, L.; Gomes, M.L.; Silva S.; Leitão, F. “Fermentação da Azeitona de Mesa da cv ‘Galega’: Estudos Químicos e Microbiológicos”. 4º Encontro de Química dos Alimentos. Junho de 1999. Coimbra.

Realização de estudos no âmbito do projecto PAMAF-IED 6030

P29. Monitorização de Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares por HPLC, em Águas de Consumo Humano, num Concelho da Grande Lisboa, por um Período de 4 Anos (1996/99)

G. M. MASSA MEDEIROS, NUNO SANTOS, ALICE I. MOSCA, ANA P. COIMBRA
CONTROLAB, LABORATÓRIO DE ANÁLISES
LAB. INORG. - PTA ANÍBAL FAUSTINO, 6 B, 2625-161 PÓVOA STA IRIA – TELF. 21 9563014
LAB. ORG. – CENTRO DE EXCELÊNCIA DO AMBIENTE, UNIV. NOVA, 2825 - MONTE DA CAPARICA

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares, PAHs, são muitas vezes, subprodutos do processamento de petróleos ou o resultado da combustão incompleta de materiais contendo na sua composição hidrocarbonetos. Como fontes de produção de PAHs destacam-se as de origem natural (os incêndios florestais ou a actividade vulcânica) e as de origem antropogênica, como as emissões dos veículos, os sistemas de produção de energia ou calor, a incineração ou o fumo de cigarro.

Muitos destes compostos são carcinogénicos a teores relativamente baixos. Estes alojam-se profundamente nos pulmões, onde iniciam a deterioração das células e possível mutação destas. Uma vez na corrente sanguínea, os PAHs são transformados pelos enzimas em compostos não tóxicos solúveis em água e capazes de serem eliminados pelo organismo, ou sofrem uma acção metabólica dando origem a uma forma capaz de provocar a mutação do DNA celular.

Apesar de serem relativamente insolúveis em água a sua natureza, altamente tóxica, exige a monitorização destes em águas de consumo humano e em águas residuais.

Neste trabalho fez-se um estudo dos níveis de PAHs presentes em águas de consumo humano distribuídas na rede de abastecimento público de um concelho da grande Lisboa. O trabalho decorreu no período compreendido entre Junho de 96 e Setembro de 99, tendo sido realizadas 16 campanhas, onde se recolheu cerca de 110 amostras. O processo de tratamento de cada amostra envolveu uma extracção líquido-líquido com diclorometano, seguida de uma concentração por evaporação e retoma em acetonitrilo. A análise foi realizada num equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC, com um detector de ultravioleta-visível.

Da análise dos resultados obtidos verifica-se que os compostos de maior número de anéis aromáticos (5 e 6) como o Benzo (a) pireno, o Benzo (g,h,i) perileno ou o Indeno (1,2,3-cd) pireno, (substâncias de maior grau de toxicidade) estão na maioria dos casos ausentes das amostras de água em estudo. Os compostos de maior peso molecular, tendem a associar-se a partículas após a sua emissão, podendo ser esta a via de retenção destas moléculas. Pelo contrário, os compostos de 2 e 3 anéis aromáticos, como o naftaleno, apresentam-se na maioria dos casos na fase gasosa, principalmente nos meses de Verão, onde as temperaturas são mais elevadas. No estudo realizado observa-se de uma forma genérica maiores teores destes hidrocarbonetos, quando se compara com os níveis determinados para os PAHs de maior peso molecular.

Apesar da menor toxicidade dos PAHs primários, a sua reacção fotoquímica na presença de NO_x pode produzir Nitro-PAHs, como p.e. o 1-nitronaftaleno, que possuem uma elevada toxicidade.

Como conclusão geral do estudo realizado verifica-se que na esmagadora maioria das amostras os teores determinados para os PAHs encontram-se dentro dos limites máximos admissíveis estabelecidos pela legislação portuguesa e comunitária.

Referências

Gibson, M.D., Jackson, M. H., Murdoch, M. F., International Environmental Technology, 1997, 25

P30. Análise de Extractos Polares de Madeira de *EUCALYPTUS GLOBULUS*: Optimização dos métodos de extracção e das condições de análise por HPLC

Sara M. Cravo, Tânia M. Silva, Fernando M. Domingues, José A. Cavaleiro
Departamento de Química - Universidade de Aveiro

A presença de taninos na madeira de eucalipto influencia o processo de produção de pasta para papel uma vez que estes contribuem para a formação de depósitos (*pitch*) que vão afectar as características da pasta [1]. Estes compostos aparecem essencialmente nos extractos mais polares das madeiras, sendo difíceis de quantificar.

Neste trabalho compararam-se vários métodos de extracção e limpeza do extracto para posterior estudo por HPLC. Foram testados três métodos de extracção directa sobre madeira moída: dois com uma mistura metanol:água (4:1) descritos na literatura [1,2], que diferem no processo de limpeza do extracto, e um terceiro só com metanol, na ausência de luz e à temperatura ambiente.

Testou-se ainda a extracção da madeira em Soxhlet com etanol, após extracção sequencial com éter etílico e acetato de etilo.

Posteriormente foram optimizadas as condições para a análise dos extractos obtidos por HPLC. Verifica-se que a melhor resolução se consegue com um programa de gradiente usando como eluentes metanol e água:metanol: ácido fosfórico (94:5:1). Testou-se, ainda, um programa isocrático, que permite determinar individualmente e de forma rápida os ácidos gálico e elágico. Concluiu-se que o método que permite a obtenção de um extracto mais completo para um cromatograma com melhor resolução e melhor linha de base é o método descrito por B. Charrier *et al.* [1].

Da extracção em Soxhlet resulta um extracto muito complexo, cuja análise por HPLC só é possível após hidrólise e fraccionamento.

Da observação dos cromatogramas confirma-se que os extractos mais polares de madeira de eucalipto são bastante ricos em compostos polifenólicos, essencialmente elagitaninos e galotaninos.

[1] B. Charrier, M. Marques, J.P. Haluk, *Holzforschung*, 1992, 46, 87-89.

[2] E. Cadahía, E. Conde, M.C. García-Vallejo, B. Fernández de Simón, *Holzforschung*, 1997, 51, 119-124.

P31. Análise de Águas de Cozedura de Cortiça por HPLC: Detecção Espectrofotometricamente e Electroquímica

Marta Luz¹, M. Rosário Bronze^{2,3}, Licínio N. Ferreira¹, Jorge M. R. de Carvalho¹, Luís Vilas Boas^{1,3}

¹ Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

² Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

³ Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

INTRODUÇÃO

Portugal é o maior produtor mundial de cortiça e as rolhas são o produto mais valioso. Na produção de rolhas há efluentes (água de cozedura) com teores elevados de compostos orgânicos entre os quais compostos fenólicos difficilmente biodegradáveis.

Estes compostos fenólicos podem ser analisados por HPLC com detecção por espectrofotometria de absorção no ultra-violeta[1]. A electroforese capilar também tem sido utilizada nas análises dos componentes da cortiça bem como dos existentes nas águas de cozedura [1,2].

Neste trabalho, usou-se nas análises por HPLC um detector electroquímico acoplado a um detector de díodos a fim de estudar o comportamento electroquímico dos compostos separados nas análises cromatográficas.

A comparação do conjunto das informações obtidas pelos dois detectores permite um conhecimento mais aprofundado da composição das águas de cozedura. O estudo do comportamento electroquímico dos vários compostos presentes nas amostras permite prever qual a sua evolução ao longo do tempo, o que pode contribuir para a discussão de métodos possíveis para tratamento destes efluentes.

EXPERIMENTAL

As amostras simuladas de águas de cozedura de cortiça foram produzidas no laboratório pondo em contacto água a ferver com pedaços de pranchas de cortiça crua. Estas amostras bem como amostras colhidas em instalação industrial foram analisadas por HPLC com detector de díodos ligado em série a um detector electroquímico.

Utilizou-se uma coluna RP18 (Merk) e pré-coluna contendo o mesmo enchimento. A análise foi feita com programação de eluente usando um gradiente com dois eluentes: ácido fosfórico 0.1% e de ácido fosfórico 0.1% com 40% de acetonitrilo.

A identificação dos compostos está a ser feita a partir das amostras fortificadas com padrões conhecidos: ácido gálico (1), ácido protocatechuico (2), ácido *p*-hidroxi-benzóico (3), ácido vanílico (4), vanilina (5), ácido elágico (6), sinapinaldeído (7) e coniferaldeído (8).

Resultados e Discussão

Na figura 1, comparam-se os dois modos de detecção (absorção no ultravioleta a 254 nm e electroquímica) e evidencia-se que alguns dos compostos responsáveis pelos picos detectados por absorção no ultravioleta são electroquimicamente activos.

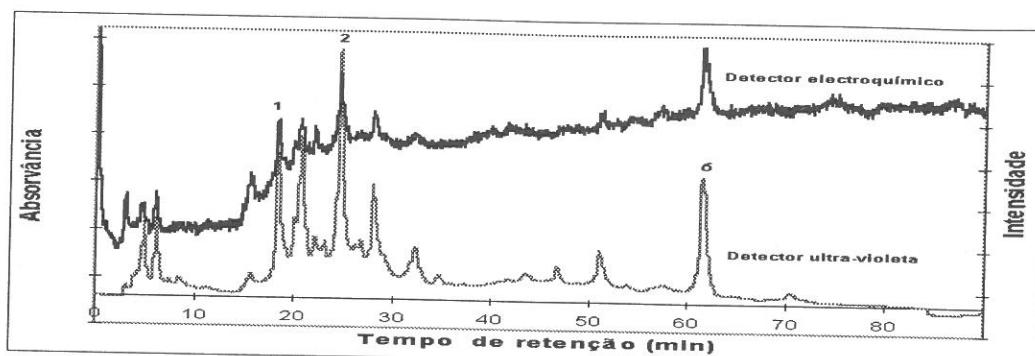


Figura 1-Cromatogramas de água de cozedura de cortiça produzida no laboratório

Os perfis cromatográficos de água de cozedura de cortiça produzida no laboratório e de uma amostra industrial, apresentam-se na figura 2.

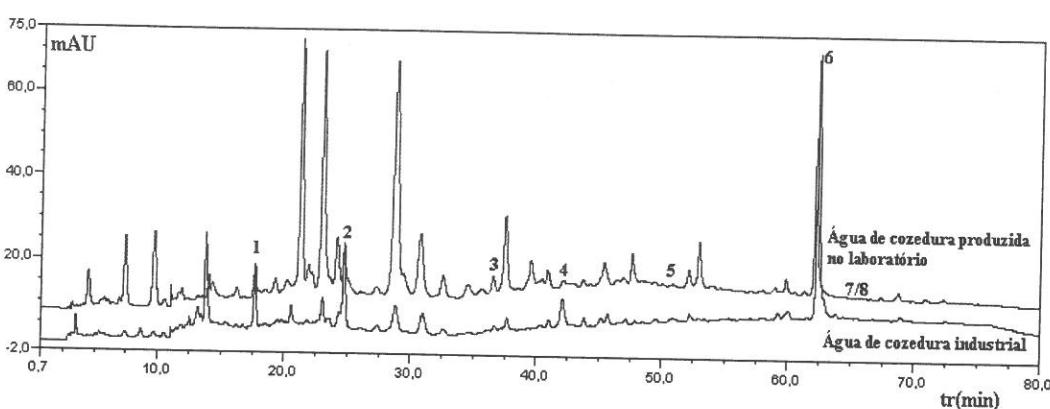


Figura 2-Cromatogramas de água de cozedura com detecção no U.V. a 254 nm

Acontece muitas vezes que amostras deste tipo são bastante instáveis quimicamente. A detecção electroquímica nestas análises tem a vantagem de permitir a obtenção de informações acerca do comportamento dos compostos presentes nas amostras em reacções de oxi-redução que podem estar na origem dessa reactividade.

AGRADECIMENTO - Agradece-se à empresa Dias de Sousa Lda. o empréstimo do equipamento de HPLC Summit.

Referências

- [1] M. R. Bronze, Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia de Lisboa, 1998.
- [2] M. R. Bronze, L. Vilas Boas, "Analysis of wine and cork extracts by capillary electrophoresis", in Aline Lonvaud-Funel (Editor), *Oenologie 95*, 641-644, 1996.

P32. HPLC Assay of Amino Acids and Oligopeptides. No Derivatization, No Multiple Calibration Curves

Higuinaldo J. Chaves das Neves

Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-114 Monte da Caparica, Portugal

The principles for liquid chromatographic separation of amino acids are two-fold: Differences on hydrophobicity of the side chain and differences in ionic strength of the zwitterionic structures. Generally this divides the amino acids in two major groups: the ones that can be separated on a reversed phase system (Ala, His, Pro, Val, Met, Tyr, Ile, Leu, Phe, Trp) and the ones that required a cationic ion-exchange mechanism (Asp, Glu, Cys, Ser, Thr, Gly, Lys, Arg). This work approaches this problem in an integrated way by using a mixed-bed column containing a C-18 bonded silica and a strong (SCX) silica-based ion exchanger. The separation of the 19 free underivatized amino acids occurs in a single run with a simple gradient profile compatible with ELSD detection. An example chromatogram is shown in Figure 1.

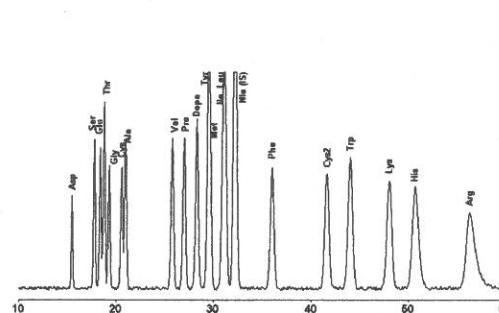


Figure 1.

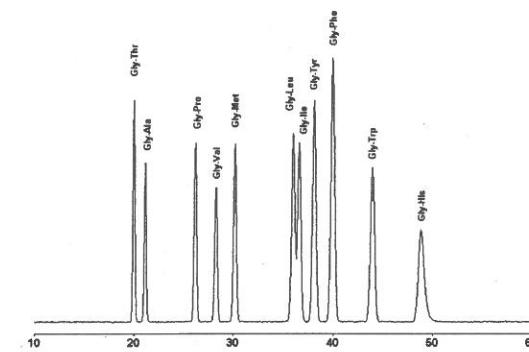


Figure 2.

The same principle can be extended to simple oligopeptides. The biochemical significance of glycyl dipeptides has lead to the application of the method to the separation of this type of compounds. The results of a HPLC assay for 11 glycyl amino acids are shown in Figure 2.

The ELSD response to mass of eluted analyte is not necessarily linear. The observed peak area (A) is related to the mass of injected compound (m) through the relationship $A = a \cdot m^x$ where x is the slope of the response line and a the response factor, although linearity can be observed at very low analyte concentrations. The detector response for individual amino acids was measured for injected amounts within the range of 50 to 1,330 ng. A very good log-log linear correlation of injected amount vs. area count (0.9955) is observed within this range. Except for cystine, which deviates from the general trend, all the amino acids have similar response line slopes, and comparable response factors. A not yet resolved limitation however is the resistance of the pairs Leu-Ile and Met-Tyr to be separated under the used conditions.

The operation of the ELSD is very easy. Reproducible response and stable base line are achieved if there are not involatile salts present in the eluent. The controls available to the operator are the nebulization gas flow rate and the temperature of the evaporator tube. These factors are responsible for particle size distribution in

the nebulization process, which may affect the detector efficiency. For the free underivatized amino acids as well as for the N-glycyl derivatives temperature was found not to be a critical parameter. Between 200 and 270 KPa no significative variance was observed for the peak areas of the analytes.

Conclusions

Free amino acids as well as oligopeptides can be separated easily in a single HPLC run by the use of simple gradient elution profile in an affordable time. No derivatization is needed and the detectability competes with the ones achieve by the most popular methods. Since the ELSD is a mass-responsive detector, one single calibration curve is adequate for all the analytes. No expensive dedicated instrumentation is needed. Except for the isolation step no other chemical manipulations are involved. Degradation of more sensitive amino acids like Trp and Cys is avoided. Percent amino acid composition of amino acid mixtures can be obtained directly from the chromatogram from the integration values of the apparent peak areas.

Acknowledgements

The financial support under EU contract MAT1-CT-930043 and the technical skills of Zilda Braga Morais are here acknowledged.

P33. Determinação de Lamotrigina em Soro Humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A. M. Almeida¹, M. M. Castel-Branco¹, A. C. Falcão¹, T. A. Macedo²,
M. M. Caramona¹, F. G. Lopez³
¹ Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra
² Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental,
Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra
³ Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Facultade de Farmácia, Universidade de Salamanca

A lamotrigina é um fármaco antiepileptico de nova geração cada vez mais utilizado na abordagem terapêutica das crises epilépticas parciais e generalizadas, tanto em tratamento adjuvante como em monoterapia. Com o objectivo de proceder ao estudo do comportamento farmacocinético/farmacodinâmico da lamotrigina desenvolveu-se uma técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para determinação dos níveis deste fármaco em soro humano.

A lamotrigina BW430C78 [3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina] e o seu padrão interno BW725C78 [3,5-diamino-6-(2-metoxifenil)-1,2,4-triazina] foram sujeitos a uma extracção líquido-líquido com acetato de etilo após basificação. A fase orgânica foi levada à secura sob corrente de nitrogénio e o resíduo obtido reconstituído em fase móvel. A separação cromatográfica processou-se numa LiChrospher 100 RP-18 (5 mm) LiChroCART 125-4, a 1 mL/min, durante 10 minutos, sendo a fase móvel constituída por 35.0% de metanol, 64.7% de KH₂PO₄ 0.1M e 0.3% de trietilamina. A detecção foi realizada num detector UV-Vis a 306 nm.

O método foi validado para níveis séricos entre 0.1 e 5 mg/L. Na análise dos dados recorreu-se à ponderação da recta de calibração, tendo em conta que a gama de concentrações considerada é bastante extensa. A validação consistiu no estudo da linearidade, sensibilidade, especificidade e selectividade, precisão, exactidão, eficiência da extracção e estabilidade. O método provou ser linear para as concentrações estudadas, apresentando um limite de detecção de 0.017 mg/L. A especificidade foi demonstrada pela comparação dos cromatogramas de 6 matrizes independentes de soro branco com o cromatograma típico da lamotrigina e do seu padrão

interno, não se observando picos aos tempos de retenção médios específicos da lamotrigina (6.90 min) e do padrão interno (2.31 min). Os fármacos normalmente utilizados em co-administração com a lamotrigina não mostraram interferir com a técnica. O procedimento analítico desenvolvido provou ser reproduzível (precisão intra- e inter-dia com coeficientes de variação de 3.61% e 6.30%, respectivamente) e exacto (viés intra- e inter-dia de -0.004% e -0.01%, respectivamente). A recuperação média da lamotrigina na presença do padrão interno foi de 82.65±3.27%. O princípio activo revelou-se estável em soro quando armazenado a 4°C durante pelo menos 4 dias e a -25°C durante 2 meses.

O método desenvolvido mostrou-se simples, rápido e adequado para a determinação dos níveis de lamotrigina em soro humano.

P34. Doseamento de Ambroxol em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

F. Martins, J. Silva, C. Neta, H. Marques, C.A. Fontes Ribeiro, T.R.A. Macedo, Centro de Estudos de Biodisponibilidade (CEB) da Associação de Apoio ao Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem (AIBILI), 3000-354 Coimbra, Portugal

O ambroxol, [trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzyl)aniinoeyclohexanol hydrochloride], um metabolito farmacologicamente activo da bromhexina, possui uma forte actividade mucolítica. É utilizado como fármaco expectorante, indicado em doenças agudas e crónicas das vias respiratórias, normalizando a formação e volume das secreções brônquicas e promovendo a remoção das secreções viscosas.

É apresentado um método por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção por ultra-violeta, para quantificação de ambroxol em plasma, utilizando como padrão interno a cetanscrina.

O doseamento do ambroxol, bem como do seu padrão interno, passa por uma extracção líquido-líquido com éter dietílico, após a tamponização e agitação das amostras de plasma. Depois de nova agitação e centrifugação, o sobrenadante é acidificado com HCl 0.01 M, ao que se segue outra agitação e centrifugação. São injectados no sistema cromatográfico 75 µL da fase inferior obtida.

As colunas analíticas utilizadas são de fase reversa (Spherisorb® S5 ODS2, 125x4 mm i.d., 5 µm, Waters) e a fase móvel consiste numa mistura de Acetonitrilo /Metanol/Tampão fosfato de potássio (pH=7) 0.01 M (41:4 1:1 8), bombeada a um fluxo de 1.5 mL/min.. A detecção é feita com um detector de UV/Vis focado a 254 nm.

Em plasma e após concentração (e com correção do padrão interno) foi observada linearidade dentro da gama de trabalho, ou seja desde 10 ng/mL (limite de quantificação) até 400 ng/mL, sendo o coeficiente de correlação médio obtido de 0.990 (n=8).

A % de variação intra-ensaio calculada foi de 3.02±0.01 e a inter-ensaio de 5.29±0.02 (médias±desvios-padrão). Este método, simples, rápido e reproduzível, foi aplicado, em particular, a um estudo de bioequivalência de ambroxol após administração oral de uma dose de 90 mg, tendo-se revelado viável e suficientemente sensível para aplicação em estudos deste tipo.

P35. Doseamento de Cisapride em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

C. Neta, F. Martins, J. Silva, H. Marques, T.R.A. Macedo, C.A. Fontes Ribeiro, Centro de Estudos de Biodisponibilidade (CEB) da Associação de Apoio ao Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem (AIBILI), 3000-354 Coimbra, Portugal

O cisapride, (\pm)-cis-4-anino-5-chloro-N-[1-3-(4-fluorophenoxy) propyl]-3-methoxy-4-piperdnyl]-2-methoxybenzamide, é utilizado como fármaco activador da motilidade gastrointestinal. Têm sido desenvolvidos alguns métodos para detecção e quantificação de cisapride em plasma humano, mas o método por nós descrito, sendo mais simples e menos demorado permite a sua aplicação em estudos de bioequivalência, onde o factor tempo é um ponto crucial.

O cisapride e o padrão interno utilizado (metoclopramida) são extraídos com 6 mL da mistura heptano:clorofórnia (65:35) a partir de amostras de 1 mL de plasma. Após agitação e centrifugação, 5 mL do sobrenadante são evaporados sob atmosfera de azoto, num banho a 55°C. O resíduo é reconstituído em fase móvel e são injectados 100 μ L no sistema cromatográfico. A detecção é feita a 276 nm com um detector de UV/Vis, utilizando colunas de fase reversa (Spherisorb® C8, 150x4.6 mm i.d., 5 μ m, da Waters) e uma fase móvel composta por dihidrogenofosfato de potássio 0.02 M/Acetonitrilo/Trietilamina (65:35:0.1), com pH acertado a 4.0 com ácido ortofosfórico, a um fluxo de 1.5 mL/min. Nestas condições, os tempos de retenção para cisapride e metoclopramida foram de cerca de 2.20 e 8.60 minutos, respectivamente.

O método mostrou-se linear de 5 ng/ml (limite de quantificação) a 200 ng/ml (em plasma, após concentração), sendo o coeficiente de correlação médio de 0.996 ($n=13$). A precisão, avaliada em 3 níveis diferentes de concentração (10, 50 e 100 ng/ml) e em termos de repetibilidade e precisão intermédia demonstrou, respectivamente, uma % de variação inferior a 10% e inferior a 15%. A exactidão, traduzida em termos de recuperação foi sempre superior a 80%.

Este método, simples, rápido e reproduzível, foi aplicado, em particular, a um estudo de bioequivalência de cisapride após administração oral de uma dose de 10 mg em solução oral, tendo-se revelado viável e suficientemente sensível para aplicação em estudos deste tipo.

P36. Identificação e Análise Quantitativa de Catiões Trocáveis em Resíduos Sólidos: Aplicação da técnica de cromatografia líquida

Maria José Madruga¹, Georgeta Alberto²

¹ITN/ Departamento de Protecção Radiológica e Segurança Nuclear, E.N.10, Apartado 21, 2686-953 Sacavém

²Direcção Geral do Ambiente, R. da Murgueira, Zambujal, Alfragide, 2720 Amadora

Resumo

A identificação e análise quantitativa de catiões de troca em resíduos sólidos constituem parâmetros importantes a considerar quando se pretendem estudar fenómenos de adsorção e troca iônica envolvendo contaminantes ambientais, tais como, radionuclídos e metais pesados. O objectivo deste trabalho é a aplicação da técnica de cromatografia de troca iônica à determinação de catiões trocáveis em resíduos sólidos, acumulados há vários anos em escombreiras (barragens de estérreis), resultantes da indústria de extração e do tratamento do minério de urânio da mina da Urgeiriça.

Neste estudo utilizaram-se amostras de resíduos sólidos recolhidas nas diferentes escombreiras da mina da Urgeiriça. O método experimental seguido (Chhabra *et al.*, 1975) baseou-se na saturação das amostras com o íão complexo monovalente tiureia prata (AgTU), o qual apresenta uma forte afinidade de adsorção para as superfícies coloidais dos resíduos sólidos, carregadas negativamente. A adição de um pequeno excesso deste íão, relativamente à capacidade de troca catiónica dos resíduos, é suficiente para assegurar uma completa saturação dessas superfícies. A técnica consistiu na extração dos catiões, por centrifugação, com uma solução de AgTU (0,01 mol dm⁻³). Esta extração vai originar uma troca completa entre a solução de tiureia de prata e os catiões trocáveis existentes nos resíduos, que passam para a fase líquida. A identificação e a determinação da concentração dos catiões existentes na fase líquida (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) processou-se por cromatografia de troca iônica.

O cromatógrafo utilizado (Dionex DX 500 IC) foi primeiro calibrado com uma solução de concentração conhecida nos iões que se pretendem analisar (padrão) e dentro da gama de concentrações das amostras a medir Madruga *et al.*, 1997). Após o traçado da recta de calibração obtida a partir do ajuste linear (método dos mínimos quadrados) entre a área do pico e a concentração do padrão, procedeu-se à análise das amostras desconhecidas. Para a aquisição e processamento de dados utilizou-se o software Chromo-Card.

Os resultados obtidos para as amostras colhidas nas barragens de estérreis apresentam valores que variam entre 0,15 - 0,40 cmol kg⁻¹ de resíduo sólido, para o potássio, 0,3 - 2,9 cmol kg⁻¹ para o cálcio e 0,1 - 1,0 cmol kg⁻¹ para o magnésio. Apesar das diferentes idades de formação das barragens de estérreis, tendo a mais antiga cerca de 30 anos e dos diferentes tratamentos químicos a que foram submetidos, ao longo dos anos, os resíduos nelas acumulados, não foi possível encontrar qualquer relação entre estes factores e os valores das concentrações em potássio, cálcio e magnésio. Estes valores estão contudo dentro da gama de valores medidos em solos aráveis (Valcke, 1993).

Os valores das concentrações em potássio, cálcio e magnésio obtidos neste trabalho irão ser aplicados em estudos sobre o comportamento do ^{226}Ra (descendente do urânio) no ambiente, permitindo correlacionar a

transferência desse radionuclido, com a dos catiões trocáveis, dos resíduos sólidos para as plantas existentes nas barragens (pinheiros, eucaliptos e giestas).

Agradecimentos: Agradece-se à Empresa Nacional do Urânio (ENU) ter autorizado a colheita de amostras nas escombeiras da mina da Urgeiriça.

Referências

- Chhabra, R., Pleysier, J. & Cremers, A. (1975). The measurement of the cation exchange capacity and exchangeable cations in soils: a new method. Proc. of the Inter. Clay Conference, Applied Publishing Ltd., USA, 439-449.
- Madruga M.J., Alberto, G. & Paiva, I (1997). Análise por cromatografia de troca iônica. Fundamentos e aplicação do Dionex DX 500IC. DPSR/SRA nº28, ISBN 972-841-07-4.
- Valcke, E. (1993). The behaviour dynamics of radiocaesium and radiostrontium in soils rich in organic matter. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

P37. A Cromatografia Iônica na Análise de Aerosóis

M. Filomena Camões¹ M. João Nunes^{1,2}, Frank Raes

¹CECUL-Departamento de Química e Bioquímica DQB, FCUL, Universidade de Lisboa ²JRC- Joint Research Centre, Environment Institute, European Comission, Ispra, Italy

A cromatografia iônica (CI) tem-se revelado uma técnica analítica de elevadas potencialidades, em particular desde 1975. A CI é o resultado de duas grandes áreas em desenvolvimento: a cromatografia e a permuta iônica. O factor que mais contribuiu para a sua utilização na análise de solutos iónicos foi a introdução da supressão da condutividade. Esta supressão diminui a condutividade do eluente e o ruído de fundo do sistema, sendo estes insignificantes face à condutividade dos iões a analisar, aumentando os seus limites de detecção. Deste modo, esta inovação permitiu a utilização desta técnica para a análise vestigária de solutos iónicos em amostras ambientais. No trabalho apresentado procedeu-se à análise da fracção solúvel de aerosóis atmosféricos.

A amostragem de aerosóis com dimensões inferiores a 10 µm foi efectuada utilizando amostradores de alto e de médio caudal de volume de ar. Com amestradores de alto e de médio caudal as amostras foram recolhidas com fluxos de ar de $0.5 \text{ m}^3\text{min}^{-1}$ e de $0.016 \text{ m}^3\text{min}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram extraídas com H₂O e a fracção solúvel de aerosol foi analisada por CI para as espécies maioritárias inorgânicas catiônicas (Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺) e aniônicas (Cl⁻, NO₃⁻ e SO₄²⁻) e aniões de ácidos orgânicos (CH₃COO⁻, HCOO⁻, CH₃SO₃⁻ e CH₃COCOO⁻). A análise por CI determina a massa de ião em µg por filtro. A concentração atmosférica é determinada tendo em conta o volume de ar amostrado.

O facto de a amostra ser extraída com o objectivo de analisar catiões, aniões e aniões de ácidos orgânicos coloca-nos perante limitações analíticas. A análise da fracção solúvel de aerosol implica que o limite de detecção da CI seja da ordem dos ppb e que o erro analítico não seja superior a 0.005 µg por filtro. Tendo em conta os objectivos a atingir, é necessário que o sistema cromatográfico seja optimizado.

Durante a optimização do método analítico constata-se que o maior factor de erro analítico é devido a contaminações. Estas contaminações não são reproduutíveis o que impede a sua contabilização. Nalguns casos elas são mais elevadas do que a concentração dos ensaios em branco dos filtros. Conclui-se que este facto é devido ao modo de injecção, tendo sido necessário alterar o injector. O modo de injecção dos sistemas DIONEX ocasiona o toque da seringa na entrada do injector o que implica a contaminação da amostra causando problemas de reproduutibilidade analítica e de limites de detecção.

Referências

- Camões, M.F. e Nunes, M.J.; "Contamination of Marine Aerosols by Anthropogenic Sources", Current Trends in Analytical Chemistry, 1, 139, 1998.
- Gjerde, Douglas T. and Fritz, James S. "Ion Chromatography", 2nd edition, Hüthig, 1987.
- Nunes, M.J.- McGovern, F.; Putaud, J.P.; Santos, S.M.; Camões, M.F. e Raes, F.; "Assessment of Sulfate Transport over the Northeastern Atlantic Ocean from Longterm Measurements", comunicação oral apresentada na 1st Euroconference on Environmental Analytical Chemistry, Neusiedl am See, Áustria, 11-17 Outubro 1997.
- Small, Hamish, "Ion Chromatography - Modern Analytical Chemistry" Plenum Press, 1989.

Agradecimentos

M. João Nunes agradece ao PRAXIS XXI pela BD4071/94 e ao Joint Research Centre, Environment Institute, European Comission, Ispra, Italy pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

P38. Study of Zn-ACE Inhibitor Complexes by LC-MS

Cristina M. L. Silva^{1,2}, M. Filomena Duarte^{1,2}, M. Lurdes Mira^{1,3}, M. Helena Florêncio^{1,2}.

1. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, Bloco C1, Piso 5, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

2. Centro de Espectrometria de Massa do IST, Complexo I, Av. Rovisco Pais, 1096 Lisboa, Portugal

3. Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina de Lisboa, 1600 Lisboa, Portugal

Zinc is essential to the catalytic activity of angiotensin converting enzyme, ACE, a metalloenzyme that plays a major role in blood pressure regulation.

Complexing agents by means of two predominant mechanisms, as suggested by Büning and Riordan¹ inhibit the activity of ACE. One of these mechanisms is proposed to occur by removal of the metal ion by an effective competition with the enzyme and the other by the formation of a stable mixed complex between enzyme, metal, and inhibitor¹.

Angiotensin converting enzyme ACE-inhibitors have became one of the most important classes of drugs for the treatment of hypertension and chronic heart failure.

It is argued that captopril and other ACE-inhibitors bind directly to the metal atom². Moreover captopril, enalaprilat and lisinopril have been observed to bind copper and iron^{3,4}.

In order to further investigate the capability of a set of ACE-inhibitors to bind zinc, we decided to study their interactions using electrospray ionisation, ESI, mass spectrometry, a soft ionisation technique which maintains the solution until the last microsecond.

The ACE-inhibitors studied were captopril, enalapril, enalaprilat, lisinopril, ramiprilat, perindopril, and perindoprilat.

The ESI mass spectra of captopril, enalapril, enalaprilat, lisinopril and ramiprilat exhibited peaks attributed to the chelation of zinc with a 1:1 metal:ligand stoichiometry. For captopril a preference for a peak attributed to 1:2 metal:ligand stoichiometry was observed in analogy to previous findings when iron was the metal atom. In addition, for lisinopril two very small peaks were detected, corresponding to 2:1 and 2:2 metal:ligand stoichiometry.

Under the present experimental conditions, peaks corresponding to the complexation of perindopril and perindoprilat with zinc, could not be detected. Further experiments in solution using ultraviolet spectroscopy are currently under study.

REFERENCES

1. P. Bunning, and J. F. Riordan, *J. Inorg. Biochem.*, 24, 183 (1985).
2. E. Carvalho, R. Asa, P.O. Gothe. *J. Inorg. Biochem.*, 62, 147 (1996).
3. M. T. Fernandez, M. M. Silva, L. Mira, M. H. Florêncio, A. Gill and K. R. Jennings, *J. Inorg. Biochem.*, 71, 93 (1998).
4. C. M. L. Silva, M. F. Duarte, M. L. Mira, M. H. Florêncio, K. Versluis and J. R. Heck, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13, 1098 (1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Portuguese PRAXIS XXI (Project 2/2.1/QUI255/94). One of the authors C.M.L.S. gratefully acknowledges a PRAXIS XXI scholarship (GGP XXI/BD3405/96).

P39. Identification of Flavonols and Anthocyanins in the Blackcurrant Juice by Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC-APCI-MS)

Cristina T. da Costa^{1,2*}, Joseph J. Dalluge², Sam A. Margolis², Derek Horton¹

¹American University, Department of Chemistry, 4400 Massachusetts Avenue Washington DC 2216

²National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, Gaithersburg, MD 20899

Current Address: Universidade de Évora, Departamento de Química, Rua Romão Ramalho 59,

7000 Évora.

Flavonols and anthocyanins are widespread secondary plant metabolites and while flavonols occur in plants as the free aglycones as well as O- and C-glycosides, anthocyanins only occur as O-glycosides. Both classes of compounds exhibit a broad range of biological properties, including anti-carcinogenic, anti-inflammatory and antiallergenic properties. Anthocyanins are also responsible for the red, purple and blue colors of fruits, and have a considerable potential in food industry as food additives. They are widely used for quality assurance and quality control in food industry. The recognized importance of flavonols and anthocyanins generates the necessity to develop fast and reliable methods for their identification in plant extracts. Crude extracts from the juice of blackcurrant berries (*Ribes nigrum*, spp, Saxifragaceae) containing both flavonols and anthocyanins were subjected to LC-MS with an APCI interface using a reversed-phase column and a mobile phase containing water, acetonitrile, and trifluoroacetic acid. The spectra were collected on positive ion mode, and under suitable conditions the $[M+H]^+$ ions of the different analytes were observed together with various fragment ions (see example in Figure 1). Fragmentation pathways of the flavonols and anthocyanins present in the juice of the blackcurrant juice were elucidated, and the identity of the different analytes was inferred. Patterns for the fragmentation of both classes of compounds under APCI conditions were recognized.

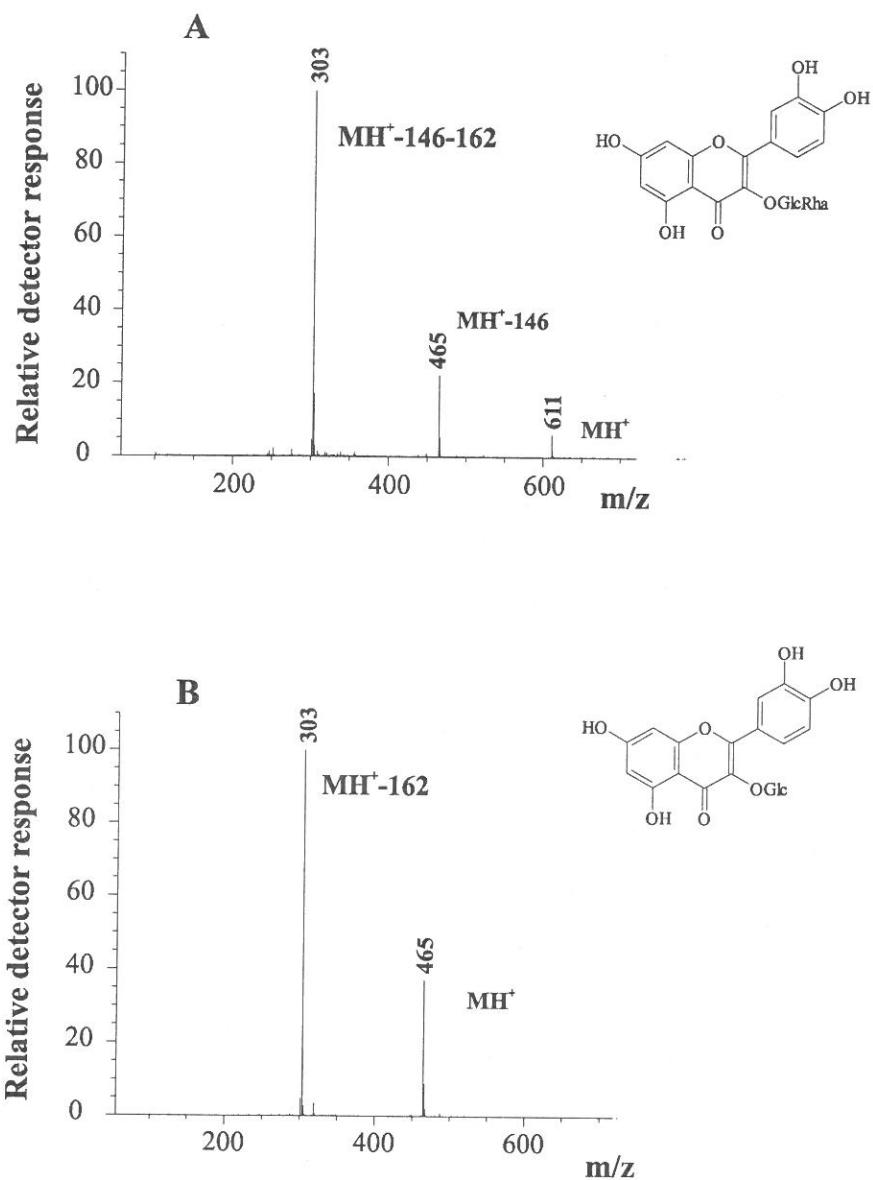


Figure 1. APCI mass spectra of quercetin derivatives.

P40. Quantificação dos Teores de Açúcares em Queijo por HPLC/IR

Olívia Pinho*, Isabel M.P.L.V.O.Ferreira, Eulália Mendes e Margarida A. Ferreira.
CEQUP/Laboratório de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
* Assistente na Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da U.P.

INTRODUÇÃO

As características dos queijos são influenciadas por múltiplos factores tais como qualidade das matérias primas, tecnologia de fabrico e condições de maturação que influenciam transformações da gordura, a lactose e a proteína vão sofrer transformações, que vão conferir aos queijos a sua especificidade relativamente ao aroma, textura e sabor.

No presente estudo desenvolveu-se e optimizou-se uma metodologia para avaliar o teor de lactose e glucose + galactose em queijos. Apesar destes constituintes estarem presentes em concentrações muito baixas (inferiores a 1%), são um importante factor na uniformidade do “flavour” e relaciona-se com a extensão de utilização da lactose para a produção de ácidos orgânicos [1]. Embora a maior parte da lactose inicial do leite ($\approx 98\%$) seja removida com o soro uma pequena parte residual contida no soro retido na coalhada é transformada em ácido láctico pelas bactérias lácticas homofermentativas e em ácido acético, fórmico, etanol, anidrido carbónico, ácido propiónico, etc. pelas bactérias lácticas heterofermentativas [2]. Os queijos que utilizam leite crú apresentam geralmente uma microflora endógena contribuindo para uma degradação praticamente completa.

MATERIAL E MÉTODOS

Aparelhagem e Condições cromatográficas

Cromatógrafo líquido de alta performance, marca Gilson, equipado com uma bomba, modelo 305 e injector Rheodyne, modelo 7125, provido de loop de 20 μ l. Detector de Índice de refracção diferencial, marca Gilson, modelo 132. Integrador Varian 4290. Membranas filtrantes Schleider & Schull, 0,2 μ m, NL 17. Como eluente utilizou-se acetonitrilo/água na proporção de 83:17, (fluxo de 1,5ml/min.); Coluna cromatográfica Spherisorb NH₂, 5 μ m, comprimento 250x4,6mm. Pré-coluna de aminas.

Amostragem

As amostras de queijo em estudo (Serra, Azeitão, Picante e S. Jorge), devidamente certificadas com selo de DOP foram adquiridas em supermercados e hipermercados do Grande Porto, no período de Novembro de 98 a Abril de 1990. Para cada tipo de queijo, foram analisados 4 lotes adquiridos em diferentes épocas do ano, as análises de cada lote foram realizadas em duplicado. Os queijos foram transportados para o laboratório em caixa isotérmica (5°C). Uma fina película externa da crosta foi retirada e a pasta homogeneizada em almofariz.

Preparação da amostra

- Homogeneizou-se uma fatia de queijo

- Pesou-se 5g de amostra e adicionar 15ml de HClO₄ 0,04N
- Extraiu-se durante 3 minutos por agitação em vortex
- Centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 min.
- Retirou-se o sobrenadante e filtrou-se através de um filtro de 0,45 μ l

Expressão dos resultados

Os resultados obtidos apresentam-se em % referido ao produto seco (% em RS). O teor de Humididade avaliou-se segundo a Norma Portuguesa 3544 [3].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que respeita ao doseamento dos hidratos de carbono por HPLC/RI verificou-se a necessidade de optimizar o processo de extração dos açúcares do queijo, para obter não só um extracto livre de interferentes, mas também resultados reprodutíveis e elevadas percentagens de recuperação. Deste modo, foram escolhidos três tipos de soluções de extração: HClO₄ 0,04M, acetonitrilo-água (75:25); acetonitrilo-água (83:17). Verificou-se que a extração com HClO₄ era mais eficaz quando comparada com as restantes, por isso este foi o solvente utilizado.

O limite de detecção do método foi de 0,2 g/l para a glucose +galactose e 0,3 g/l para a lactose. Obteve-se linearidade no intervalo de concentrações de 0,2 a 20 g/l.

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados médios obtidos para os 4 lotes de cada um dos queijos em estudo.

Tabela 1 – Composição em açúcares^{a)}

	Serra	Azeitão	Picante	S. Jorge
Glucose + galactose	0,6±0,2	0,4±0,3	0,5±0,2	0,5±0,2
Lactose	n.d.	n.d.	n.d.	0,3±0,1

a) Os resultados exprimem-se em % em RS \pm sd (n=8)

CONCLUSÕES

A metabolização da lactose foi quase completa nos queijos da Serra, de Azeitão e Picante da Beira Baixa. Somente no queijo de S. Jorge se detectaram pequenas quantidades de lactose (0,3±0,1%).

No seguimento deste trabalho pretende-se avaliar a evolução dos teores em açúcares ao longo da maturação destes queijos, em simultâneo com a formação de ácidos orgânicos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bouzas, J., Kantt, C.A., Bodyfelt, F., e Torres, J.A. (1991) Simultaneous determination of sugars and organic acids in cheddar cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, Vol.56, nº1, 276-278.
- [2] Macedo, A.C., e Malcata, F. X. (1997) Changes of lactose, lactic acid and acetic acid contents in Serra cheese during ripening. *Z. Lebensm. Unters Forsch A* 204, 453-455.
- [3] Norma Portuguesa NP 3544 (1987) Queijos e Queijos Fundidos. Determinação do resíduo seco e do resíduo seco isento de matéria gorda.

SEMINÁRIOS

Avaliação da Cromatografia Iônica para Especificação de Catiões de Metais Pesados em Águas

Rocha Gomes

Dias de SOUSA, Pta Aníbal Faustino, 6 B, 2625-161 Póvoa Sta Iria – Telf. 21 9563014
Universidade de Aveiro, 3810 Aveiro

Exploraram-se as potencialidades da cromatografia iônica (CI) para separar as fracções operacionalmente lábeis e inertes de complexos de metais pesados. O método envolve derivatização em coluna com ácido 2,6-piridinodicarboxílico (PDCA) e separação por permuta iônica seguida por reacção de derivatização pós-coluna com 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) para formar quelatos metálicos que podem ser detectados espectrofotometricamente a 520 nm.

Os metais estudados foram o Ni(II), Mn(II), Zn(II) e, mais extensivamente, o Cu(II). Usou-se como ligandos (L): citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenodiamina-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA) e ácido 1,2-diaminaclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA).

Foram analisadas soluções contendo $12,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catião metálico (M(II)) e $12,6$ ou $25,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ligando. Obtiveram-se 100% de recuperação para todos os metais com citrato ou NTA, para Cu(II), Zn(II) e Mn(II) com EDTA e para Mn(II) com CDTA. As recuperações obtidas nos restantes casos foram Ni(II)-EDTA $\leq 68\%$, Ni(II)-CDTA $\leq 80\%$, Cu(II)-CDTA $\leq 20\%$ e Zn(II)-CDTA $\leq 87\%$. Para interpretar estes resultados, analisaram-se soluções mais simples, contendo apenas Cu(II), $12,6$ ou $6,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e razões (R) Cu(II):L compreendidas entre 4,2 e 0,26. Para citrato e NTA obtiveram-se recuperações de praticamente 100% com Cu(II) para todos os valores de R . Para EDTA, apenas se obtiveram recuperações de 100% para $R \geq 1,0$. Para CDTA, as recuperações situaram-se entre 76% ($R = 4,2$) e 0% ($R \leq 0,52$). Cálculos de especificação mostraram que não se tratava de problemas de equilíbrio químico, pelo que seriam factores de ordem cinética os únicos responsáveis pela ineficiência dos processos de derivatização, tanto em coluna como pós-coluna. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente. As implicações analíticas são discutidas e são apresentados vários processos de correção deste tipo de interferências.

APOIOS

GRUPO DIAS DE SOUSA

<http://www.dias-de-sousa.pt/>



Dias de Sousa Lda/SA, é um dos mais importantes distribuidores de equipamento analítico e científico existentes no mercado português, oferecendo aos seus clientes a mais vasta e completa gama deste tipo de instrumentação.

Dias de Sousa Lda/SA é igualmente a empresa principal do grupo Dias de Sousa, constituído para além da firma mãe, de empresas na área dos "Serviços Analíticos e Pesquisa" (CONTROLAB LDA), na área do "Ambiente" (AMBICONTROL LDA).

Dias de Sousa Lda/SA, é uma empresa com constante espírito de inovação e progresso que tenta constantemente melhorar os serviços prestados aos clientes.

Na linha desta filosofia, desenvolveu-se em Fevereiro de 1994, um conceito de Grupo de Apoio ao Cliente, que trata não só de toda a parte de apoio técnico aos equipamentos fornecidos, mas também é responsável pelos Contratos de Manutenção, Garantias dos Equipamentos, Consumíveis, Peças de Reserva, "Upgrades", garantindo assim um SERVIÇO completo pós-venda aos clientes.

A firma Dias de Sousa iniciou a sua actividade em Portugal em 1983 com a distribuição de Cromatógrafos Gasosos e foi a primeira firma a ter à disponibilidade dos clientes um Laboratório de Aplicações.

Dias de Sousa Lda.,
Praceta Aníbal Faustino, 6B-2825 Póvoa de St. Iria
Tlf: 219533120
Fax: 219533129
e-mail: diasdesousa@mail.telepac.pt



DIAS DE SOUSA LDA

Praceta Aníbal Faustino, 6B 2625 Póvoa de St. Iria - 01-9592316



EMÍLIO DE AZEVEDO CAMPOS & CIA, LDA

Hucoa-Elbow

Waters



SOQUÍMICA

Sociedade de Representações de Química, Lda.