



PATROCÍNIOS

*Sociedade Portuguesa de Química
Departamento de Química e Bioquímica da FCUL
Departamento de Química da FCT/UNL
Fundação para a Ciência e Tecnologia
Fundação Calouste Gulbenkian
Câmara Municipal de Lisboa
Associação de Turismo de Lisboa
Hucoa Erloss Equipamento Científico
Unicam Sistemas Analíticos
Praxair Portugal Gases SA
Emílio de Azevedo Campos, Lda.
Dias de Sousa, Lda.
Soquímica
J.M. Vaz Pereira
Merck-Eurolab
Teknokroma (GLP)
Technospec
Livraria Escolar Editora
Banco Espírito Santo*



Actas do 2º Encontro Nacional de Cromatografia

Fundamentos

Desenvolvimento

Aplicações



SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA

2º ENCONTRO NACIONAL DE CROMATOGRAFIA 2001

Lisboa 2001



2º Encontro Nacional de Cromatografia

Ficha Técnica

Editores

Sociedade Portuguesa de Química
DQB / Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
DQ-CQFB / Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Depósito Legal Nº
173672/01

Impressão:
Trialgráfica

Tiragem:
200 exemplares

Esta publicação reúne as comunicações apresentadas no 2º Encontro Nacional de Cromatografia, sob a forma de Lições Convidadas, Comunicações Orais e em Painéis.
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

José Manuel F. Nogueira (DQB/FCUL)
Ana Costa Freitas (DQ/FCT/UNL)
Marco Gomes da Silva (DQ/FCT/UNL)

Comissão Científica

Adriano Teixeira – INETI (Lisboa)
Ana Costa Freitas – FCT/UNL (Lisboa)
Cristina T. da Costa – UE (Évora)
H. Chaves das Neves – FCT/UNL (Lisboa)
Isabel Ismael – UBI (Covilhã)
Ivonne Delgadillo – UA (Aveiro)
João Pessoa – IST (Lisboa)
Joaquim Branco – ITN (Lisboa)
José Manuel F. Nogueira – FCUL (Lisboa)
Luís Vilas Boas – IST (Lisboa)
Marco Gomes da Silva – FCT/UNL (Lisboa)
Maria H. Florêncio – FCUL (Lisboa)

ÍNDICE

<u>LICÓES CONVIDADAS</u>	1
LP-1. State-of-the Art Capillary GC Needs. Novel Dedicated Sample Preparation Methods	3
LMP-1. Profiling Cannabinoids by GC-MS/MS in Sport Doping Control	5
LMP-2. Cromatografia Gás-Líquido Multidimensional. Sua Importância na Monotorização da Quiralidade	6
LP-2. A Comprehensive Multidimensional Future for Gas Chromatography.	7
LMP-3. Purification of a DNA Vaccine Using Hydrophobic Interaction Chromatography	10
LMP-4. Monitorização de Desreguladores Endócrinos por Técnicas Cromatográficas	12
LP-3. Considerations on the Selection of Columns and Ionization Modes for LC-MS	14
LMP-5. The Use of LC-APCI-MS for the Analysis of Plant Phenolics	15
<u>COMUNICAÇÕES ORAIS</u>	17
O-1. As Técnicas Cromatográficas e os Progressos nos Estudos dos Aromas	19
O-2. HPLC Monitoring of the Synthesis and Purification of β -Functionalized Tamoxifen Derivatives	21
O-3. Naturally Occurring Phenolic Antioxidants in Medicinal Plant Extracts	23
O-4. Optimization of Solid Phase Microextraction for the Analysis of Essential Oils	25
O-5. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução Para Determinação de Fenbendazol em Pré-Misturas Medicamentosas e Alimentos Compostos para Animais	26
O-6. Chiral Chromatographic Separations by Simulated Moving Bed Technology	27
O-7. Técnicas Cromatográficas Aplicadas à Determinação de Toxinas Produzidas por Algas	30
O-8. Applicability of CZE for the Authentication of PDO Ovine Cheeses Coagulated With <i>Cynara L.</i> (Preliminary Study)	32
O-9. Clivagem do Grupo Tritilo em Derivados Glucídicos por Cromatografia de Adsorção	37
O-10. Como “apanhamos” os Atletas Portugueses!	38
O-11. Separation of Fragrant Compounds from Geranium Essential Oil Using Liquid Chromatography	40
O-12. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Headspace SPME Analysis in a Wine Model	43
O-13. Optimização e Validação da Análise de Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares em Águas por HPLC com detector de Fluorescência e Diode-Array, utilizando como Método de Preparação da Amostra a Extracção Líquido-Líquido	45
O-14. Headspace Solid Phase Microextraction Use for the Characterization of Volatile Compounds in Olive Oils	47
O-15. Aplicação de SPME/GC-MS na Determinação do Aroma Varietal em Vinhos Madeira	49

COMUNICAÇÕES EM PAINEL	
CROMATOGRAFIA GASOSA	
P-1. Licor de Murta: Contributo para o Conhecimento da Evolução de Compostos Terpénicos	53
P-2. Simultaneous Determination of Target Analytes from Four Groups of Pesticides in Water Samples Using a Bipolar SPME Fibre and GC-MS	55
P-3. Aplicação da Técnica de "Purge & Trap" à Análise de Compostos Voláteis do Aroma do Queijo	56
P-4. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation	58
P-5. Enantiomeric Ratio of Chiral Compounds During Malolactic Fermentation in Portuguese Wines	60
P-6. Improvement of The Detection limits for Wine aroma compounds Determination	62
P-7. CHARManalysisTM – Uma Técnica de Avaliação dos Odorantes – Chave de Alimentos	64
P-8. Characterization of Olive Oil, with Different Attributes, by its Volatile Compounds Pattern	66
P-9. Extraction of Olive Oil Volatiles with two Different Adsorbents and Minimum Breakthrough	67
P-10. Phenolic Compounds and Antioxidants Activity in Medicinal Plant Extracts	69
P-11. Method for the Determination of Environmental Endocrine Disruptors in Aqueous Samples Using SPME-HPLC and SPME-GC	71
P-12. Estimativa da incerteza de medição e validação de métodos cromatográficos	72
P-13. Curcuphenol and Curcudiol, Bioactive Metabolites From The Marine Sponge <i>Didiscus oxeata</i>	73
P-14. Detecção de Contaminações Microbianas em Sumo de Laranja Natural por Micro-Extração em Fase Sólida	75
P-15. CG-EM No Estudo do Aroma de Aguardentes Lourinhã Envelhecidas em Madeira de Carvalho	78
P-16. Quantificação dos Ácidos Gordos Polinsaturados no Soro e nas Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), por Cromatografia Gasosa (GC), e Determinação do α-Tocoferol, por HPLC, em Duas Populações Madeirenses	80
P-17. Análise de Resíduos de Contaminantes em Águas de Consumo Usando Técnicas de Injeção de Grandes Volumes. Comparação de PTV LVI, OCLVI e SPME	82
P-18. Characterization of Madeira Wines Aroma by HS-SPME-CGC-MSD	84
P-19. Optimisation and Validation by SPE-CGC-MSD of the Analysis of Tributyltin in Environmental Samples	87
P-20. Monitorização de Desreguladores Endócrinos em Estuários Nacionais por SPE-PTV-CGC-MSD	89
P-21. Volatile Composition of Banana Cultivars from Madeira Island by CGC- MSD	90
P-22. Analysis of the Volatile Fraction of Pine Trees: Comparisson Between Two different Sampling Methods and an Electronic Nose Device	92
P-23. Application of Stable Isotope Dilution Assay for Quantitative Analysis of Free Fatty Acids in Ewe Cheese	93
	51

P-24. As Películas como Fonte Potencial de Aroma nos Vinhos Brancos da Casta Maria Gomes	96
P-25. Essential Oil Composition of <i>Hypericum Perforatum L.</i> and <i>Hypericum Perfoliatum L.</i> from Portugal	98
P-26. Comparação de Perfis Cromatográficos de Azeites Monovarietais e Respectivas Matérias Primas	100
P-27. Comparação de perfis cromatográficos de tomates e produtos derivados	103
COMUNICAÇÕES EM PAINEL	105
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ELECTROFORESE CAPILAR	
P-28. Determinação de Trans-2-Nonenal em Cerveja por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Espextrofotométrica	107
P-29. HPLC Analysis of Alkaloids from Marine Sponges From <i>Agelas spp.</i>	109
P-30. Isolation of Phenolic Compounds from <i>Ficus carica</i> Leaves by Column Chromatography Followed by Solid Phase Extraction	110
P-31. The use of LC-APCI-MS to Identify Prenyl Phenolic Compounds in Plant Extracts	111
P-32. Determinação do Ergosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Concentrado de Tomate	112
P-33. Estudos por HPLC Quiral e Não Quiral de Kielcorinas isoméricas Obtidas por Síntese	113
P-34. Electrodialytic Remediation of Creosote Treated Timber Waste: The Chromatographic View	115
P-35. Estudo de Alguns Problemas Analíticos da Cromatografia Iônica	116
P-36. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução Com Derivatização Pós-coluna para Determinação dos Teores de Monensina, Narasina e Salinomicina em Alimentos para Animais: Estudo Interlaboratorial ISO	118
P-37. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução para Determinação de Tilosina em Pré-Misturas Medicamentosas e Alimentos Compostos para Animais	119
P-38. Determinação do Ergosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia em Concentrado de Tomate	120
P-39. Caracterização Composicional dos Constituíentes de Plantas Micropagadas de <i>Dittrichia viscosa</i> por HPLC e CGC/MSD	121
P-40. Estudo da Composição em Aminoácidos Livres do Queijo de Azeitão por RPLC-DAD	122
P-41. Análise de Níveis de Resveratrol em Amostras de Vinho da Madeira por SPE/CE/DAD	123
P-42. Determinação do Teor de Aminoácidos por cromatografia de Troca Iônica em Concentrado de Tomate	124
P-43. Validação dos Métodos de Doseamento das Vitaminas B1, B2, B6 em Pescado	125
P-44. A Cromatografia Iônica na Análise de Catiões em Plantas	127
P-45. Determination of the Hard Segmented Chain Length Distribution in a Segmented Polyester Polyurethane Analytical Procedure	129
P-46. Detecção de Fungicidas na Película de Uvas por SPE/HPLC DAD	131
P-47. Separação e Quantificação por HPLC de Doxiciclina, Tilosina e Bromexina em Pré-Misturas Medicamentosas para Animais	133

P-48.	Validação de um Método Cromatográfico para a Análise de Parabenos em Sistemas Farmacêuticos Líquidos	136
P-49.	Determinação do Cloridrato de Dobutamina por HPLC – Comparação de um Método Interno COM UM Oficial – USP XXIV	138
P-50.	Análise de Compostos Fenólicos por HPLC na Diferenciação de Aguardentes <i>Lourinhã</i> Envelhecidas em Madeira de Carvalho Nacional de Diferentes Origens Geográficas	140
P-51.	Análise de Aguardente de Medronho por HPLC e Electroforese Capilar	142
P-52.	Nectares de Pêra: Perfis Cromatográficos e Comparação com os Resultados da Avaliação Sensorial	145
P-53.	Comparação de Perfis Cromatográficos de Tomates e Produtos Derivados	148

LIÇÕES CONVIDADAS



LP-1. State-of-the Art Capillary GC Needs. Novel Dedicated Sample Preparation Methods

Pat Sandra

Research Institute for Chromatograph,
Kennedypark, 20, B-8500 Kortrijk, Belgium

Phone: 32-56-204031, Fax: 32-56-204859, e-mail: pat.sandra@richtom.com

Key words : stir bar sorptive extraction (SBSE), headspace sorptive extraction (HSSE), thermal and liquid desorption, quality control, trace analysis, food, beverages.

State-of-the-art capillary GC needs dedicated sample preparation methods. In this contribution, several new developments in sample preparation will be presented with emphasis on sorptive extraction.

In sorptive extraction, solutes are enriched by a partitioning mechanism. The advantages of sorptive extraction have been described in the recent literature and several sorptive techniques have been developed like solid phase microextraction (SPME), open tubular trapping (OTT) and enrichment on sorbent particles.

Two novel, very powerful and simple approaches for sorptive extraction namely the application of stir bars or of rods coated with a thick layer of polydimethylsiloxane (PDMS) are presented.

In stir bar sorptive extraction (SBSE), the stir bars are coated with a layer of 25 to 125 μl PDMS on a magnet incorporated in a glass tube. The stir bar, commercialized as TWISTER, is introduced in the sample and after a certain stirring time, the stir bar is removed from the sample and transferred to a thermal desorption instrument where the analytes are thermally released and on-line transferred to a capillary GC-MS/AED or ICPMS instrument. As an alternative the stir bars can be desorbed by liquid extraction followed by conventional or large volume injection. The same principle can be applied for LC-MS analysis. SBSE was evaluated for quality control and for trace analysis of contaminants in aqueous samples like beverages, milk, yoghurt, cheese, etc. Compared to SPME a strongly increased amount of sorbent is used resulting in a 500 times increased sensitivity compared to a SPME fiber coated with a 100 μm PDMS film. Limits of detection are as low ng/L or ppt as will be illustrated with the sunstruck flavour in beer and the cork flavour in wine.

In headspace sorptive extraction (HSSE), the same principle applies but the PDMS is coated on a glass rod that is placed in the headspace of liquid or solid samples. Typical applications that will illustrate the power of HSSE include the aroma of coffee and the ripening of bananas. Also in HSSE, unsurpassed sensitivities can be reached.

LMP-1. Profiling Cannabinoids by GC-MS/MS in Sport Doping Control

Douwe de Boer and António Ajenjo

Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica

Centro de Medicina Desportiva (Estádio Universitário) Av. Prof. Egas Moniz 1600-190

Lisboa

Cannabinoids are compounds that are unique to the *Cannabis* plant species. They are amongst others the active compounds in Cannabis (also known as Marijuana) or Hashish. Because of social reasons, the use of certain cannabinoids in sport is subjected to restrictions and therefore analytical methods must be available to detect it. The detection of the use of cannabinoids using urine samples is in sport doping control based on a mass spectrometric determination of the main urinary metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, namely 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (Δ^9 -THCCOOH). We have developed a GC/MS/MS method in order to determine Δ^9 -THCCOOH qualitatively and quantitatively in a short period of time. The application of MS/MS was especially required in order to eliminate interfering peaks in the chromatograms and to avoid the implementation of additional sample preparation steps. The applied derivatisation was a trimethylsilyl derivatisation, the selected ionisation mode Electron Ionisation (EI) and the precursor ion the fragment $[M - CH_3]^+$. The product ion mass spectrum of the selected precursor ion $[M - CH_3]^+$ consisted of only a limited number of ions, but the respective fragments were characteristic. The structures of the product ions can be designated analogously to those obtained in the normal EI scan mode.

Analytical validation of the GC/MS/MS method resulted in the following characteristics: limits of detection and quantification of the equipment 0.4 and 1.3 ng/mL, respectively, extraction recovery 68%, limits of detection and quantification of the total method 0.6 and 1.9 ng/mL, respectively, and the linearity range 5 – 80 ng/mL.

With our method and without additional efforts we also detect qualitatively the cannabinoid 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabivarin-9-carboxylic acid (Δ^9 -THCVCOOH).

LMP-2. Cromatografia Gás-Líquido Multidimensional. Sua Importância na Monitorização da Quiralidade

M. D. R. Gomes da Silva
Centro de Química Fina e Biotecnologia CQFB ,Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, PT - 2829-516 Caparica, Portugal

A análise enantioselectiva adquiriu na década passada um significado muito importante, tendo sido utilizada nos últimos anos, sobretudo, na determinação das razões enantioméricas específicas de constituintes de óleos essenciais. O método, após a introdução das colunas de ciclodextrina modificadas, como fases estacionárias eficientes, conheceu um impulso muito forte na sua utilização, não obstante os encargos com equipamento que lhe estão associados. Assim, um conjunto variado de compostos quirais pode ser separado nos seus antipodas ópticos num conjunto igualmente vasto de matrizes.

A directa utilização de uma coluna quiral na análise de matrizes complexas era bastante limitada, dada a complexidade dos extractos, que conduziam frequentemente às inevitáveis co-eluições e consequentemente a um constrangimento dos resultados potenciais: separação eficiente e inequívoca de todos os enantiómeros dos constituintes da matriz em causa.

O desenvolvimento da cromatografia gás-líquido multidimensional, que combina uma coluna aquiral como pré-coluna e uma coluna quiral como coluna analítica, permitiu a análise directa de compostos a partir de extractos obtidos de matrizes complexas, alargando claramente o campo de aplicação de ambas as técnicas.

A discriminação quiral, que constitui um princípio importante na biosíntese de compostos naturais, conduz entre outros, à caracterização específica de plantas de acordo com as relações enantioméricas encontradas. Assim, por exemplo, os componentes quirais do aroma de origem natural permitem caracterizar matrizes, de acordo com a distribuição dos enantiómeros no seu perfil. O conhecimento da gama de variação da distribuição dos enantiómeros permite assim utilizar este método para verificar, por exemplo, a autenticidade de óleos essenciais e classificá-los.

LP-2. A Comprehensive Multidimensional Future for Gas Chromatography.

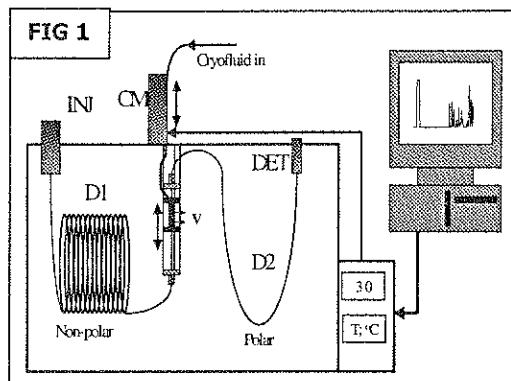
Philip J. Marriott

Chromatography and Molecular Separations Group
Department of Applied Chemistry, RMIT University
GPO Box 2476V, Melbourne, Australia
email: philip.marriott@rmit.edu.au

Gas chromatography (GC) is by any measure a mature technology. Analysts use GC routinely – almost automatically – without any question of its ability to deliver qualitative and quantitative measurements for almost any type of volatile and semi-volatile sample. An extensive array of peripheral technologies are available to expand the applicability of GC to different sample introduction modes – large volume injection, headspace analysis, purge and trap, PTV – and detection methods – mass and atomic spectroscopy, molecular spectroscopies, ionisation detection. Over many years we have applied the technique to almost any sample imaginable, and have employed both high-resolution single capillary columns and some innovative multidimensional and coupled column methods. And so some may argue that GC has reached its zenith. But can it be improved upon? Giddings was passionate about multidimensional capabilities in chromatography, and considered the power of such a system if it could be developed into a ‘continuous 2D’ instrumental method. He was aware of the efforts of the multidimensional gas chromatography (MDGC) conventionally performed using limited heartcuts during an analysis, but this was not where he felt the limit of GC lay, because it did not apply the multidimensional advantage to the total sample. If he could see the present state of comprehensive GCxGC analysis, then maybe he could see that his predictions of the ultimate GC analysis had been realised.

We have developed over the past 5 years a cryogenic modulation method that has proven to deliver a range of new possibilities in high resolution and sensitive GC analysis. In fact, these are the two very central goals of all chromatographers – to separate solutes better, and to do so on increasingly smaller amounts of analyte. These have driven most of the innovations in GC.

The longitudinally modulated cryogenic system (LMCS) is shown in Figure 1. The cryotrap traps migrating peaks, and quickly expels them to the second column. A simple concept; a powerful opportunity! Thus we can conduct a modified 'conventional' MDGC experiment if the sample is suited to this analysis. We can also collect complete peaks just prior to the detector and pulse them with very high mass flux -- and sensitivity - into the detector.



But one very novel application is the comprehensive two-dimensional gas chromatography method. By pulsing the solute from column 1 to column 2 we get a method that gives continuous 2D GC for the whole sample analysis. This is done by moving the cryotrap back and forth with a period faster than the duration of the width of a peak eluting from the first column. The figure presents a GCxGC result for a semi-volatile aromatic sample, using a BPX5-BPX50 column combination. The first of the columns in the ensemble is of normal dimensions, and the second is a short, fast elution column, usually of 1m x 0.1mm ID x 0.1 μ m film thickness.

As can be seen here, peaks are distributed over the total separation space, and some peaks which would be unresolved on the first column are now resolved in 2D. This is shown by the dotted lines on **Figure 2**. Additionally, each pulsed peak has a greater peak height than would be found in a single column analysis.

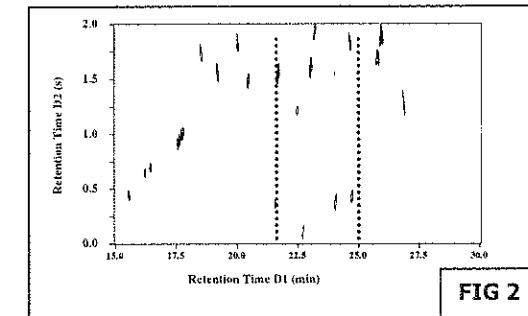


FIG 2

This presentation will show how cryogenic modulation may be used, what sorts of studies can be conducted, and how it may lead a new direction to the future of GC. So we do see GC as moving much more decisively into a multidimensional gas chromatography future, since these methods are now easily implemented, are relatively easy to interpret, and provide much power to the analyst. Much work is now being undertaken to demonstrate this new research area. The presentation will be supported by applications in various areas such as environmental analysis and essential oils.

LMP-3. Purification of a DNA Vaccine using Hydrophobic interaction Chromatography

João Queiroz^a, Margarida Diogo^{a,b} and Miguel Prazeres^b

^aDep. de Química, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, ^bCentro de Eng. Biológica e Química, Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa

The development of techniques and methods for the separation and purification of biomolecules has been essential for many of the recent advancements in biotechnology research.

The success and validity of gene therapy and DNA vaccination *in vivo* experiments and human clinical trials depend on the ability to produce large amounts of pure plasmid DNA according to defined specifications. Although hydrophobic interaction chromatography (HIC) has been essentially used to purify proteins [1], the recent interest in nucleic acid products as gene therapy agents has stimulated the use of HIC to purify nucleic acids [2].

HIC provides a powerful additional means of separation as it displays binding characteristics complementary to other chromatographic techniques. In HIC, the addition of salting-out salts (e.g. ammonium sulfate) to the equilibration buffer decreases the availability of water molecules in solution, increases the surface tension and enhances the ligand-biomolecule interactions.

This work describes a new method for the purification of an experimental DNA vaccine against rabies, that includes an ammonium sulfate precipitation followed by HIC using a Sepharose gel derivatised with 1,4-butanediol diglycidyl ether [3]. The use of HIC took advantage of the more hydrophobic character of single stranded nucleic acid impurities, when compared with double stranded plasmid DNA. RNA, denatured genomic and plasmid DNAs, with large stretches of single strands, and lipopolysaccharides that are more hydrophobic than supercoiled plasmid, were retained and separated from non-binding plasmid DNA in a HIC column.

Control analysis showed that the vaccine, purified by the HIC above procedure, conforms to specifications in terms of impurities. The identity of the DNA vaccine was confirmed by digestion with restriction enzymes. HPLC and agarose gel electrophoresis proved the absence of RNA from the final plasmid preparation. No protein was detected using the micro BCA assay and a residual value of genomic DNA was detected by

Southern slot blot analysis. Endotoxin levels in the final purified plasmid were lower than 0.00004 EU/µg plasmid DNA, which is a very good value since gene therapy plasmids are required to comply with a specification of <0.1 EU/µg plasmid DNA. Furthermore, the final experimental vaccine induces rabies-virus-neutralising antibodies and protects mice against a rabies virus challenge [3].

The process presented constitutes an advance over existing methodologies, is scaleable and meets quality standards since it does not require the use of additives that usually pose a challenge to validation and raise regulatory concerns.

- [1] Queiroz et al. 2001, *Journal of Biotechnology*, **87**, 143-159.
- [2] Diogo et al. 2000, *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 576-583.
- [3] Diogo et al. 2001, *Journal of Gene Medicine*, in press.

LMP-4. Monitorização de Desreguladores Endócrinos por Técnicas Cromatográficas

J.M.F. Nogueira

DQB/FCUL e CCMM, Campo Grande Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

Desregulador ou disruptor endócrino (*endocrine disrupter*) é o termo dado a toda a substância ou mistura de substâncias exógenas, capazes de assumir a mesma função de uma hormona natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal da mesma, alterando as funções do sistema endócrino e consequentemente, prejudicar a saúde do organismo, da sua progenitora ou (sub)população. Os efeitos adversos observados com mais frequência verificam-se ao nível da reprodução anómala, indução cancerígena e afectação neurológica e imunológica ao nível do Homem e da vida selvagem. A maioria destas substâncias antropogénicas, são fundamentalmente poluentes químicos e derivados de químicos que são usados nos pesticidas organoclorados (ex. DDT), plásticos (ex. ftalatos), detergentes (ex. *p*-nonilfenol), lacas (ex. bisfenol A), tintas (ex. tributilo estanho) e outros materiais vulgarmente usados, assim como de diversos tipos de resíduos industriais (ex. PCB's) ou mesmo domésticos (ex. dietilstibestrol).

Actualmente, diversas organizações internacionais evidenciam sérias preocupações com respeito à acção nefasta dos desreguladores endócrinos uma vez serem claramente perniciosos em concentrações situadas abaixo das partes por bilião, sendo os recursos hídricos particularmente pressionados, justamente por serem o principal veículo de dispersão global para este tipo de compostos.

Para monitorização dos desreguladores endócrinos, as técnicas cromatográficas e hifenas, caso da cromatografia gasosa capilar e cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massa (CGC-MSD e LC-MSD), têm demonstrado ser bastante sensíveis e selectivas na identificação e quantificação de um vasto grupo de xenoestrogénios em matrizes aquosas, sedimentos e biota.

A preparação das amostras para análise deste tipo de compostos, tem evoluído no sentido da adopção de técnicas que permitam aumentar os limites de detecção, recuperar selectivamente analitos com diversa polaridade e reduzir ao mínimo a quantidade de solventes utilizada. Neste sentido, as técnicas de extracção em fase sólida (SPE), microextracção em fase sólida (SPME) e os mais recentes desenvolvimentos de extracção por sorpção em barra de agitação (SBSE), baseadas em princípios de adsorção

selectiva, têm vindo a substituir gradualmente a extracção líquido-líquido (LLE) convencional.

A necessidade premente de conhecer as substâncias mais perigosas não é, em geral, totalmente compatível com a capacidade e o tempo de resposta dos métodos usuais, pelo que é essencial investir cada vez mais em técnicas que identifiquem o máximo número de xenoestrogénios somente num ensaio, designados por métodos de multiresíduo e que sejam aplicáveis em larga escala, para controlar o maior número de amostras possível.

Neste contexto, os novos desenvolvimentos cromatográficos, nomeadamente a "injecção de grande volume" (LVI) para incrementar sensibilidade, o "controlo pneumático dos gases de arrastamento" para aumentar a reproductibilidade da retenção (RTL) e a "monitorização selectiva de iões" (SIM) para incrementar selectividade, parecem ser a aposta mais adequada para a análise de xenoestrogénios, fundamentalmente quando conjugados e automatizados.

A presente contribuição tem por objectivo abordar as técnicas cromatográficas actualmente mais recomendadas no sentido da eficiente monitorização dos desreguladores endócrinos.

Referências

- IEH 1995. Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Institute for Environment and Health, University of Leicester, Leicester, UK.
- Oosterkamp A.J., Hock B., Seifert M., Iirth H. (1997) Novel monitoring strategies for xenoestrogens, Trends Anal. Chem., 16 (10) 544-553.
- Lacorte S., Guiffard I., Fraisse D., Barceló D. (2000) Broad Spectrum Analysis of 109 Priority Compounds Listed in the 76/464/CEE Council Directive Using Solid-Phase Extraction and GC/EI/MS, Anal. Chem., 72 (7) 1430-1440.

(Financiado pela FCT: PDCTM/C/MAR/15283/1999)



LP-3. Considerations on the Selection of Columns and Ionisation Modes for LC-MS

Pat Sandra^{1,2}

Research Institute for Chromatography, Kennedypark 20, B-8500 Kortrijk, Belgium.

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

pat.sandra@richrom.com

Mass spectrometry (MS) is slowly but surely becoming the detector of choice for LC analysis in many areas. Translating methods from conventional LC-UV to LC-MS is often required because optimised LC-UV mobile phases usually contains buffers and additives to enhance selectivity and chromatographic performance that have a negative effect on MS ionisation, MS performance and maintenance of the mass spectrometer. Moreover, depending on the LC-MS configuration at hand, the total or only part of the effluent is directed towards the MS optics. On the other hand, and this became possible because of the high selectivity of the MS, column dimensions changed drastically over the last years leading to high throughput screening in, for example, combinatorial chemistry, clinical/pharmaceutical studies, bioanalysis, etc. An overview is presented of column and mobile phase selection for LC-MS. Also the possibilities of atmospheric pressure electrospray ionisation (APESI), chemical ionisation (APCI), photo-ionisation (APPI) and coordination ionspray ionisation (APCIS) in relation to the selected LC mode are discussed in detail. Relatively simple guidelines are advanced to successfully optimise LC-MS and LC-MS/MS for a large number of applications. Most illustrations are from the laboratories of the author.



LMP-5. The Use of LC-APCI-MS for the Analysis of Plant Phenolics

Cristina Teixeira da Costa*, Sam A. Margolis**, Derek Horton#

*Universidade de Évora; **National Institute of Standards and Technology (EUA); # American University (EUA)

The plant phenolics are secondary metabolites with an extraordinary diversity and ubiquitous in the plant kingdom. No universal function in plants has yet been established for plant phenolics, but there is an increasing number of epidemiological studies that have linked their human consumption with low incidences of cancer and cardiovascular diseases in some populations.

The disappearance of the tropical forests and other areas of vegetation has meant that it is essential to have access to methods of rapid isolation and identification of these as well as other bioactive natural compounds. The frequent unavailability of standards makes the long and tedious procedure of collecting material to identify the chemical structure of each individual compound (known and unknown) a common, although highly inefficient, procedure in plant analysis. It has long been recognized that the screening of plant extracts can be considerably expedited by direct combining high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection (LC-MS). A major breakthrough in the application of LC-MS methods has come with the development and commercialization of interfaces involving atmospheric pressure ionization. For example, the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface can handle flow rates up to 1.5 mL/min, being suitable to operate with an analytical column.

Extracts from various plant parts of *Ribes nigrum* and *Malura pomifera*, rich in various families of plant phenolics, were subjected to LC-APCI-MS. The major known compounds of all extracts were identified, along with some novel compounds. Because the APCI interface involves a new ionization mode, data concerning the analysis of plant phenolics is limited. However, similarities between the APCI spectra obtained from the different classes of plant phenolics and their reported fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS), enabled the elucidation of fragmentation pathways and structure of major ions.



2º Encontro Nacional de Cromatografia

COMUNICAÇÕES ORAIS

O-1. As Técnicas Cromatográficas e os Progressos nos Estudos dos Aromas

Maria Cristina Clímaco

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

E-mail: inia.evn.tec@oninet.pt

Os estudos dos aromas nos produtos alimentares surgiram com o advento da cromatografia em fase gasosa no início dos anos cinquenta. A introdução da análise olfactiva do efluente da coluna cromatográfica [1] constituiu um avanço importante nesta área. Posteriormente, as técnicas a ela associadas foram alvo de sucessivos desenvolvimentos por parte de alguns autores [2,3] que, ao sugerirem a introdução de um fluxo de ar húmido na saída aquecida do efluente da coluna de CG, criaram as bases da Cromatografia Gasosa-Olfactometria (CG-O).

A química dos aromas assenta no estudo da percepção do odor e a significância dum pico num cromatograma de CG produzido por um detector de ionização de chama deve ser aferida pela resposta olfactiva que produz. É contudo de ter em consideração que não são apenas as substâncias químicas que diferem na sua actividade odorífera, mas que também os seres humanos diferem na sua resposta às substâncias odorantes.

Actualmente, as técnicas de CG-O incluem métodos que podem ser classificados em três categorias: de diluição, de intensidade e de frequência de detecção [4].

As técnicas *Charm Analysis* [5] e *Aroma Extract Dilution Analysis* (AEDA) [6] baseiam-se na análise de sucessivas diluições de um extracto de aroma e permitem a pesquisa dos respectivos compostos chave; a *Odor Specific Magnitude Estimation* (OSME) [7] é utilizada na medição da intensidade odorífera perceptível dos compostos eluídos pela coluna de CG e finalmente, a *Olfactometric Global Analysis* (OGA) [8,9] baseia-se na detecção de frequência, onde são estabelecidas relações entre a área dos picos cromatográficos, as características de cada odor detectado e a frequência da sua detecção.

As técnicas de CG-O são presentemente consideradas ferramentas de grande utilidade, por possibilitarem aos investigadores caracterizar os odorantes chave nos produtos naturais, avaliar a acuidade sensorial de provadores e elevar o seu grau de precisão na análise descriptiva. No que se refere à indústria alimentar, aquelas técnicas permitem o

estabelecimento de relações entre a análise química dos produtos e os dados sensoriais definidores da sua qualidade.

Esta comunicação visa dar um contributo no âmbito das técnicas de cromatografia gasosa-olfactometria e das suas potencialidades no estudo dos aromas.

Agradecimentos

A autora agradece à Assessora Eng^a Maria Luísa Avelar a preciosa colaboração na elaboração desta comunicação.

Referências Bibliográficas

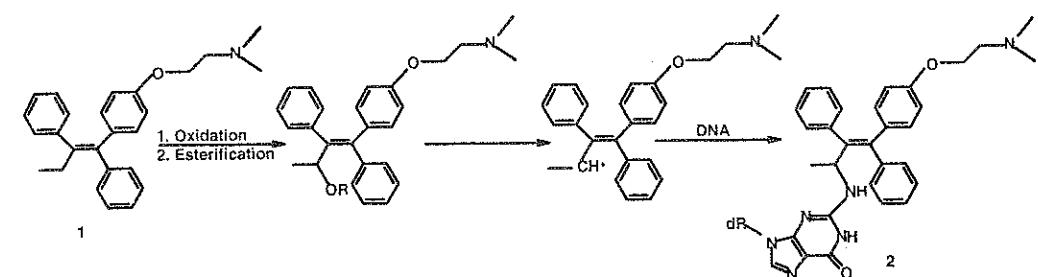
- Guadagni D.G., S. Okano, R.G. Buttery e H.K. Burr, (1966) *Food Technology* 20, 166-169.
- Dravniek A. O'Donnell , (1971) *J. Agric. Food Chem.* 19, 1049-1056.
- Acree T. E., R.M. Butts, R. R. Nelson, C.Y. Lee, (1976) *Anal. Chem.* 48(12), 1821-1822.
- Le Guen S., C. Prost, M. Demaimay, (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 1307-1314.
- Acree T.E., J. Barnard, D.G. Cunningham, (1984) *Food Chem.* 14, 273-286.
- Ulrich F., W. Grosh, (1987) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184, 277-282.
- McDaniel M.R., R. Miranda-Lopez, B.T. Watson, N.J. Micheals, L.M. Libbey, (1990). In: Charambous, G. (Ed), *Flavors and Off-Flavors*; pp 23-25. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Van Ruth S.M., J.P. Roozen, M.A. Posthumus, (1995) *J. Sci. Food Agric.* 69, 393-401.
- Ott A., L.B. Fay, A. Chaintreau, (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45, 2630-2637.

O-2. HPLC Monitoring of the Synthesis and Purification of β -Functionalized Tamoxifen Derivatives

M. Cristina Melo e Silva^{a,b}, Gonçalo Gamboa da Costa^a, and M. Matilde Marques^a

^aCentro de Química Estrutural, Complexo I, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal, and ^bInstituto Tecnológico e Nuclear, 2686-953 Sacavém, Portugal

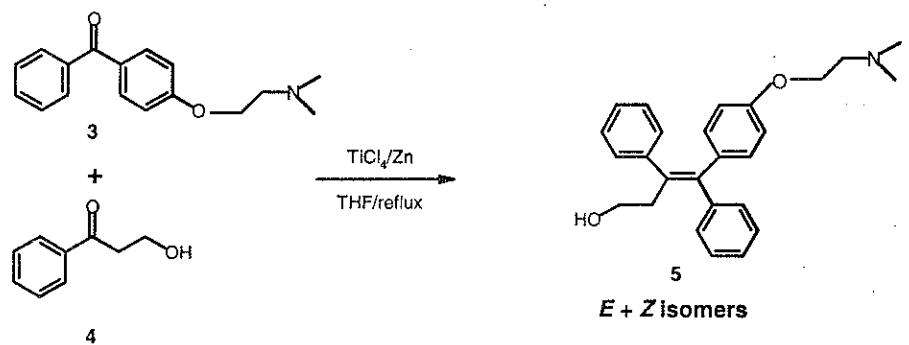
Tamoxifen (TAM, 1) is a triphenylethylene-based antiestrogen of widespread use as a chemotherapeutic and chemopreventive agent for breast cancer. However, recent reports suggest that it may be genotoxic to humans in a process that is initiated by metabolic oxidation at the allylic (α) carbon, and ultimately yields covalent DNA adducts such as 2 (Scheme 1).



Scheme 1

The aim of the present study is the synthesis and evaluation of β -halogenated triphenylethylene derivatives as potentially safer alternatives to tamoxifen. Due to the electronwithdrawing properties of the halogen atoms, these β -halo tamoxifen derivatives should be less prone to α -oxidation *in vivo*. Furthermore, halogenated triphenylethylene derivatives are suited for radiolabelling and should be useful in estrogen receptor imaging since halogens are known to increase the affinity for the estrogen receptor.

We have explored a synthetic approach to these tamoxifen analogues, involving the crossed reductive coupling of a 4-substituted benzophenone (3) with β -hydroxypropiophenone (4) by way of a McMurry reaction, to yield a mixture of diastereomeric *E* and *Z* derivatives (5), which can be separated by chromatographic techniques and ultimately halogenated by standard procedures.

**Scheme 2**

Details will be presented on the useful monitoring of the synthesis of **4** from its precursors, as well as of the McMurry reaction, by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection. The same technique has allowed a suitable control of the separation of **5** from its *Z* diastereomer.

O-3. Naturally Occurring Phenolic Antioxidants in Medicinal Plant Extracts

Cristina M. L. Silva^{1,2}, Suzana Palhais¹, M. Lurdes Mira^{1,3} Alda Pereira da Silva³ and M. Helena Florêncio^{1,2}

1. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, Bloco C8 Piso 6 Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal
2. Centro de Espectrometria de Massa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Bloco C8 Piso 6, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal
3. Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa, 1600 Lisboa, Portugal

The medicinal properties of several plants such as *Crataegus Oxyacantha*, *Hamamelis Virginiana*, *Hydrastis Canadensis*, *Geranium Robertianum*, *Croton Lechleri*, *Olea Europaea* and *Allium Sativum* have been used with success in the treatment of a number of cardiac, circulatory and anti-inflammatory problems.

Some of the possible mechanisms proposed to explain the medicinal properties of these plants are related with the antioxidant properties of a number of their components, such as the phenolic compounds.

The purpose of this work was to examine the relative antioxidant activity of these plant extracts, their total content in phenolic compounds and to identify the antioxidant volatile compounds present in some of them.

The content in phenolic compounds was measured according to the method of Sharma *et al.*¹ and the total antioxidant activity by the 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)/Horseradish peroxidase (HRP) end point method². The data obtained enabled to establish the following relative order of antioxidant potential: *Croton Lechleri* > *Hamamelis Virginiana* > *Geranium Robertianum* > *Crataegus Oxyacantha* > *Olea Europaea* > *Allium Sativum*.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry, GC-MS, enabled to perform a preliminary chemical characterization of the antioxidant volatile compounds present in some of the extracts studied³.

REFERENCES:

1. H. M. Sharma, A. N. Hanna, E. M. Kaufmann and H. A. I. Newman *Free Rad. Biol. Med.*, **18**: 687-697 (1995).



2. A. Cano J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Cánovas, M. Acosta and M. B. Arnao, *Phytochemical Analysis* 9: 196-202 (1998).
3. A. P. Silva , R. Rocha, C. M. L. Silva, L. Mira, M. F. Duarte and M. H. Florêncio, *Physiotherapy Research*, 14, 612-616 (2000).

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/BD/3405/96.



O-4. Optimization of Solid Phase Microextraction for the Analysis of Essential Oils

Eduardo Mateus & M. Rosa Paiva

GUECKO/DCEA, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, P-2825-114 Campus de Caparica, Portugal

The study of essential oils, as products of secondary metabolism of conifer trees, is of interest for research in chemotaxonomy, particularly because they can also be related to the trees physiological condition and in particular to damage caused by forest insects.

Sample preparation is an important step in the analysis of essential oils. Techniques such as steam distillation, solvent extraction and headspace analysis and more recently solid phase microextraction (SPME) are used.

The use of SPME, for the study of essential oils obtained by headspace analysis is presently increasing. However, little has been studied concerning to the variables that could influence the method performance in real samples.

In this paper, the influence of fiber coating, sample storage (time and temperature), equilibrium time after storage removal, fiber extraction time and terpenes distribution constants, between the gas phase and the fibers, were studied using real samples, collected from pine trees. For each sample, an average of 0.85g of plant material was cut, and placed inside a 7.0 ml headspace vial for extraction. The SPME extraction was performed using polydimethylsiloxane (100, 30 and 7 mm PDMS), PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB) 65mm and polyacrylate (85 mm PA) fibres. The chromatographic analysis was conducted on a HP 5890 gas chromatograph (Hewlett Packard) equipped with a DB-5 column (30 m x 0.32 mm i.d.; 1.0 mm film thickness) and a flame ionisation detector (FID).

Studies of different extraction conditions for the SPME method and a comparison with others methods of sample preparation, established for the analysis of essential oils, such as steam distillation extraction (SDE) and solvent extraction are presented. Furthermore, some applications of SPME to the analysis of essential oils from pine materials are shown.



O-5. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução Para Determinação de Fenbendazol em Pré-Misturas Medicamentosas e Alimentos Compostos para Animais

Simões N., Ribeiro V., Felgueiras, I.

DTIA - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI-LIA

Estrada do Paço de Lumiar, 1649-038, Lisboa, Portugal
e-mail: Ildia.Felgueiras@mail2.ineti.pt

O fenbendazol (FBZ) é um aditivo pertencente à família dos benzimidazoles e é usado como agente anti-helmíntico de largo espectro, indicado para o tratamento e prevenção de infecções provocadas por parasitas gastro-intestinais e pulmonares de bovinos, ovinos, equídeos, porcinos, caninos e felinos.

Em suínos, a dose terapêutica sugerida está entre 5 e 20 ppm no alimento composto, durante 5 a 10 dias. Após ingestão, o fenbendazol é absorvido pelo intestino e rapidamente metabolizado no seu sulfóxido (FBZSO), que também tem uma acção anti-parasitária. O FBZSO é posteriormente oxidado a sulfona (FBZSO₂), consideravelmente menos activo.

O fenbendazole e os seus metabolitos são compostos hidrofóbicos, fracamente básicos, com solubilidade apreciável em solventes orgânicos polares, como o acetato de etilo e o diclorometano, e com partição quantitativa igualmente apreciável entre tampões fosfato e esses dois solventes.

Tendo em conta estas propriedades, foi delineado e optimizado um método de extração líquido-líquido usando acetato de etilo e ácido fosfórico. Os extractos obtidos são analisados HPLC em fase reversa, usando uma coluna cromatográfica termostatizada a 50°C, com detecção por UV a 290 nm.

Este método tem demonstrado ser eficaz na determinação de fenbendazol em pré-misturas medicamentosas e alimentos compostos para suínos.



O-6. Chiral Chromatographic Separations by Simulated Moving Bed Technology

Luís S. Pais^{1,2} and Alfrío E. Rodrigues²

1. Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1134, 5301-857 Bragança, Portugal.

2. Laboratory of Separation and Reaction Engineering, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

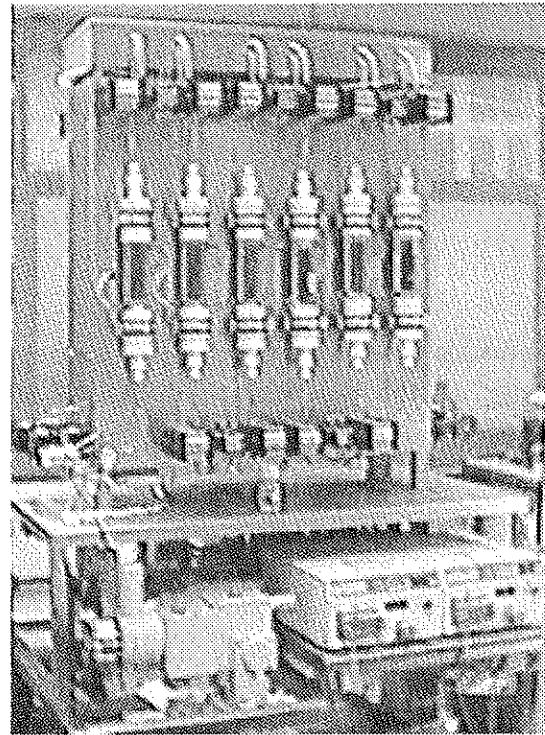
Chiral chromatographic resolution of enantiomeric species is becoming of increasing importance in the development and the production of pharmaceutical drugs. Large-scale chromatographic separations were in the past limited mainly due to the high cost of the adsorbent, the high dilution of products, and the large amounts of mobile phase needed. In view of these demands, SMB technology has been recently applied to the pharmaceutical industry and its use at production-scale has been considered as an alternative to up to now leading techniques such as enantioselective synthesis or diastereoisomeric crystallization.

A Simulated Moving Bed adsorber is essentially a binary separator, so particularly appropriated for chiral separations. Briefly, SMB chromatography allows the continuous injection and separation of binary mixtures. The simulated countercurrent contact between the solid and liquid phases maximizes the mass-transfer driving force, leading to a significant reduction in mobile and stationary phases consumption when compared with elution chromatography. Several pharmaceutical companies and custom chemical manufactures are installing commercial-scale SMB units for producing enantiomeric compounds. The list is rapidly increasing and includes Aerojet Fine Chemicals (USA), Bayer (Germany), CarboGen Laboratories (Switzerland), Chiral Technologies (USA), Daicel (Japan), Honeywell Specialty Chemicals (Ireland), H. Lundbeck (Denmark), Merck (Germany), UCB Pharma (Belgium), and Universal Pharma Technologies (USA).

Two chiral systems were studied experimentally in a SMB pilot unit (*Licosep 12-26, Novasep*, France) available at the LSRE (*Laboratory of Separation and Reaction Engineering*, University of Porto, Portugal): the bi-naphthol and the chiral epoxide enantiomers. For the bi-naphthol system purities and recoveries higher than 95% were obtained for both extract and raffinate with a productivity of 34 Kg of each enantiomer per day and cubic meter of adsorbent bed. The solvent consumption was 1.2 liter per

gram of racemic mixture processed. For the chiral epoxide system 98% pure extract and raffinate were obtained, with a productivity of 17 Kg of each enantiomer per day and per cubic meter of adsorbent bed, and a solvent consumption of 1.3 liter per gram.

This work will introduce the principles and applications of SMB technology. Modeling and simulation tools for the evaluation of the best operating conditions will be presented. Experimental results obtained in the SMB pilot unit will show the potential of this technology for the separation of racemic mixtures of enantiomers.



The Licosep 12-26 Simulated Moving Bed pilot unit at the Laboratory of Separation and Reaction Engineering, Porto, Portugal.

References:

- Rodrigues and Pais, "Modelling and Simulation in SMB for Chiral Purification," in *Chiral Separation Techniques*, G. Subramanian, ed., Wiley-VCH, p. 221-254 (2000).
- Pais *et al.*, "Chiral Separation by SMB Chromatography," *Sep. Purif. Tech.* 20 67-77 (2000).
- Pais *et al.*, "Separation of Enantiomers of a Chiral Epoxide by Simulated Moving Bed Chromatography," *J. Chromatogr. A*, 827, 215-233 (1998).

Pais *et al.*, "Separation of 1,1'-bi-2-naphthol Enantiomers by Continuous Chromatography in Simulated Moving Bed," *Chem. Engng Sci.*, 52, 245-257 (1997).



O-7. Técnicas Cromatográficas Aplicadas à Determinação de Toxinas Produzidas por Algas

J. M. Leão-Martins, N. Piñeiro Costas, M. Carballal Aguete, M. Nogueiras, E. Vaquero, A. Gago Martínez, J. A. Rodríguez-Vázquez.

Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus Universitario de Vigo, E- 36200 – Vigo, España

Nos últimos anos tem-se observado um aumento significativo da contaminação do meio aquático , tanto a nível marinho como em águas doces, devido à presença de compostos tóxicos de origem natural. Esta contaminação deve-se à presença de dois tipos de influências antropogénicas, por um lado o efeito de nutrientes devido à contaminação industrial, urbana assim como de contaminantes de origem na exploração agrícola ou mesmo em águas residuais de origem doméstico. O aumento destes contaminantes nas águas, assim como outros parâmetros físico-químicos levam à proliferação massiva de algas produtoras de toxicidade. Entre diversas espécies encontram-se os dinoflagelados produtores de toxicidade diarreica (DSP), paralizante (PSP), as diatomáceas produtoras de toxicidade amnésica (ASP) e por outra parte as espécies de cianobactérias tóxicas responsáveis de diferentes tipos de toxicidade que aparece em águas doces. O tipo de intoxicação causada por estes compostos a nível da cadeia alimentar, mesmo a níveis muito baixos, justifica a necessidade da procura de metodologias analíticas sensíveis para a detecção deste tipo de biotoxinas.

Entre os métodos biológicos, bioquímicos e mesmo químicos propostos para o controlo deste tipo de compostos, estes últimos são aqueles que apresentaram uma evolução acelerada em termos da análise. O uso de técnicas cromatográficas despertou um grande interesse no que se refere à separação de diversos componentes tóxicos em matrizes biológicas complexas, o uso desta técnica acoplada a diferentes sistemas de detecção, entre os quais se inclui a Espectrometria de Massas, permitiu chegar a grandes avanços em termos de confirmação da presença deste tipo de compostos tóxicos tanto em águas como em matrizes biológicas.

Este estudo centra-se na optimização de metodologias cromatográficas aplicadas à análise de compostos tóxicos de origem natural anteriormente referidos.



Neste estudo apresentam-se um exemplo de aplicação de técnicas de cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) na determinação de toxinas PSP, DSP, ASP assim como de toxinas de cianobactérias.

O-8. Applicability of CZE for the Autentication of PDO Ovine Cheeses Coagulated With *Cynara L.* (Preliminary Study)

Luisa Bivar Roseiro¹, Mónica R. García-Risco² and Elena Molina²

¹Unidade de Indústrias Lácteas (UIL) - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares (DTIA) INETI, Estrada do Paço do Lumiar, nº22, 1649-038 Lisboa

²Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI), CSIC, C/ Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid

INTRODUCTION

Certain varieties of ovine cheeses produced in the Iberian Peninsula are since Roman times traditionally made with aqueous extracts from dried cardoon flowers (*Cynara L.*) as coagulants. Examples of these are Casar de Cáceres, Torta del Casar, La Serena and Los Pedroches cheese from Spain, and Serra da Estrela, Serpa, Azeitão, Castelo-Branco and Nisa cheese from Portugal. These cheeses are very appreciated due to their soft creamy texture and exquisite flavour, characteristics that are associated with the use of the vegetable coagulant (Barbosa, 1993; Roseiro & Barbosa, 1996). Some of them carry the EC label of Protected Designation of Origin (PDO), making compulsory the use of local pure ovine raw milk and *Cynara L.*, (usually *C. cardunculus L.* or *C. humilis L.*), as coagulant. Such is the case of La Serena and Serpa cheeses, which are getting increasing consumer demand, due not only to their particular characteristics, but also the fact of using a vegetable as coagulant enables them adequate for a number of cheese consumers, to whom the use of animal rennet is controversial owing to religious matters (Jewish and Islam), dietary matters (vegetarianism), environmental matters (animal rights activists), or due to being against genetic engineered foods and more recently, due to the BSE problem. This increasing demand might lead to the addition of milk from other species to extend production, and/or the substitution of vegetable coagulant by animal rennet, being the latter easier to get and use. Both the addition of other species' milk and the use of animal rennet are considered frauds, particularly in PDO cheeses. Detection of milk mixtures in cheese has been done commonly by immunological and conventional electrophoretic methods (Amigo *et al.*, 1992; Levieux and Venien, 1994), and recently by capillary electrophoresis (Cattaneo *et al.*, 1996; Cartoni *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 1999). However, detection of the coagulant origin in cheese is not yet possible to do. In the last years, capillary electrophoresis (CE), especially capillary zone electrophoresis (CZE) has shown to be a suitable technique for food authentication, particularly for dairy products authentication (Recio *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1999,

2000; Ardö *et al.*, 1999; García-Risco *et al.*, 2000). The aim of the present study was to evaluate the applicability of CZE for the identification of the coagulant used in the cheesemaking of the referred artisanal cheeses, since this has a major importance from the PDO cheeses point of view and also for the sake of consumers with specific dietary requirements.

MATERIAL AND METHODS

Cheesemaking Trials

9 Serpa cheeses were made in a certified dairy within its demarcated region of production in Baixo Alentejo, Portugal, according to the traditional cheesemaking procedure for this type of cheese, using a freshly prepared aqueous extract of flowers from *Cynara L.* as coagulant. Another 9 cheeses were made in the same dairy, from the same milk batch and by the same cheesemaker, according to the procedure used for Serpa cheese, but coagulated with animal rennet (Bovigrand 22, 1:15 000, SBI -Systems Bio-Industries). Milk and a curd sample from each sort of cheese were collected on the day of manufacture. All the cheeses were matured in the same conditions and during this period, 3 cheeses from each sort were collected at 30, 45 and 60 days of maturation. In a second dairy also located in the demarcated region of Serpa cheese, samples of milk and cheeses made with aqueous extracts of *Cynara L.* on the same day as the previous ones, were also collected at 0 (curd), 30, 45 and 60 days of maturation time.

Isolation of caseins

Caseins from milk, curd and cheese samples from both vegetable and animal coagulants production at different maturation times were prepared according to the method described by Molina *et al.* (2000).

CZE separations

CE buffers and separation conditions were as described by Recio & Olieman (1996). CZE was carried out in a Beckman apparatus P/ACE System 2050 controlled by a System Gold Software data system version 810 (Beckman Instruments Inc., San Ramon, CA 94583-0701, USA). Prepared samples of milk, curd and cheese were filtered through 0.22 • m filter (Sterile Acrodisc, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI 48106, USA) and injected at the anode in duplicate. UV detection was at 214 nm.

O-10. Como “apanhamos” os Atletas Portugueses!

Olga Afonso, Sara Vieira e Carmo Manzoni

Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica

Centro de Medicina Desportiva (Estádio Universitário), Av. Prof. Egas Moniz

1600-190 Lisboa

Em análises de controlo da dopagem no desporto recorre-se a várias metodologias denominadas “triagens” para identificação de compostos das várias classes de substâncias proibidas pelo Comité Olímpico Internacional (COI).

Uma das triagens, através das técnicas de GC/NPD e GC/MS, permite a detecção de compostos básicos, azotados e voláteis, excretados pelo organismo humano numa forma não conjugada. Deste modo, para além das substâncias proibidas pelo COI, é muitas vezes possível detectar a presença de “picos desconhecidos” nos cromatogramas.

A presença de “picos desconhecidos” pode interferir com o processo analítico. Pode ainda constituir um bom indicador das substâncias que os atletas andam a tomar ou de que andam a “abusar”, para além das substâncias proibidas pelo COI.

Neste contexto, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de uma estratégia que permita a identificação de compostos no Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica.

A estratégia actual consiste em várias fases. Em primeiro lugar, os espectros de massas obtidos são comparados com espectros de massas das bases de dados internas e toxicológicas forenses. Estas bases contêm, entre outros, espectros de agentes dopantes presentes em vários medicamentos. Os dados são comparados com a medicação declarada pelos atletas e com os resultados obtidos através das metodologias complementares. Se os “picos desconhecidos” não são identificados, obtém-se dados complementares através de derivações com anidrido acético ou anidrido trifluoroacético, sendo os espectros obtidos comparados com os espectros de massas relevantes. Procede-se, em seguida, a uma confirmação por comparação com espectros de massas de compostos de referência ou de amostras de urina fisiológicas.

Caso não seja possível a sua identificação, a informação obtida na análise dos “picos desconhecidos” é conservada numa base de dados especial.

Serão apresentados exemplos de “picos desconhecidos” detectados no Laboratório, cuja identidade foi posteriormente encontrada por meio desta estratégia.

García-Risco, M.R., Molina, E. and López-Fandino, R. (2000). Capillary electrophoresis and Western blotting detection of ovine and caprine cheese whey added to bovine milk. Milchwissenschaft, 55 (10), 555-559.

Molina, E., Frutos, M. and Ramos, M. (2000). "Capillary electrophoresis characterisation of the casein fraction of cheese made from cow's, ewe's and goat's milks". Journal of Dairy Research, 67, pg. 209-216.

Acknowledgements

The financial support of Project POCTI 35257/2000 from the Fundação para a Ciência e Tecnologia of the Portuguese Ministry of Science and Technology is greatly acknowledged.

The author Luisa B. Roseiro is particularly grateful to Dr. Manuela Barbosa and Dr. Mercedes Ramos for all the support and facilities provided by IFI-CSIC in Madrid, in order to accomplish this study.

O-9. Clivagem do Grupo Tritilo em Derivados Glucídicos por Cromatografia de Adsorção

M. Isabel Ismael^a, J. Albertino Figueiredo^a, Jorge Pinheiro^a, Amélia P. Rauter^b

(a) Departamento de Química, Universidade da Beira Interior,

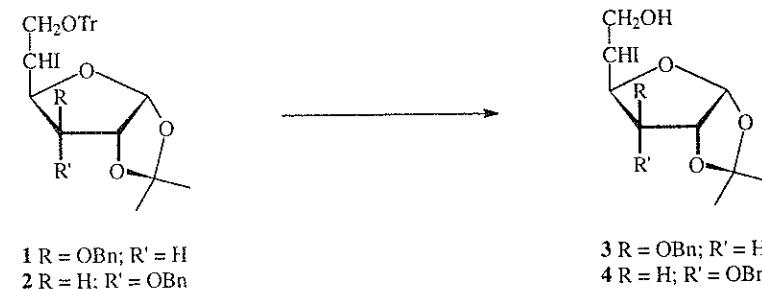
Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, PORTUGAL

(b) Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Ed. C8, 6ºPiso, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

A técnica de cromatografia de adsorção em coluna é muito utilizada para a purificação e separação de compostos orgânicos. Aplicando esta técnica a derivados glucídicos com grupos tritilo, foi possível efectuar a clivagem deste grupo protector através deste método.

Após submeter os compostos 1 e 2, individualmente, a uma cromatografia de adsorção para purificação, verificou-se que se formavam os compostos 3 e 4, cuja obtenção pode também ser efectuada por via sintética, como por exemplo com meio ácido aquoso. No entanto, através desta técnica cromatográfica foi possível obter estes compostos de um modo mais fácil e rápido.

O método consistiu em fazer passar os compostos 1 e 2 por uma coluna de cromatografia com silice-gel 230-400 mesh e eluente acetato de etilo/tolueno, na proporção de 1/5, obtendo-se os compostos 3 e 4, com um rendimento superior do que quando foram preparados pelo método tradicional.





O-10. Como “apanhamos” os Atletas Portugueses!

Olga Afonso, Sara Vieira e Carmo Manzoni

Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica

Centro de Medicina Desportiva (Estádio Universitário), Av. Prof. Egas Moniz

1600-190 Lisboa

Em análises de controlo da dopagem no desporto recorre-se a várias metodologias denominadas “triagens” para identificação de compostos das várias classes de substâncias proibidas pelo Comité Olímpico Internacional (COI).

Uma das triagens, através das técnicas de GC/NPD e GC/MS, permite a detecção de compostos básicos, azotados e voláteis, excretados pelo organismo humano numa forma não conjugada. Deste modo, para além das substâncias proibidas pelo COI, é muitas vezes possível detectar a presença de “picos desconhecidos” nos cromatogramas.

A presença de “picos desconhecidos” pode interferir com o processo analítico. Pode ainda constituir um bom indicador das substâncias que os atletas andam a tomar ou de que andam a “abusar”, para além das substâncias proibidas pelo COI.

Neste contexto, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de uma estratégia que permita a identificação de compostos no Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica.

A estratégia actual consiste em várias fases. Em primeiro lugar, os espectros de massas obtidos são comparados com espectros de massas das bases de dados internas e toxicológicas forenses. Estas bases contêm, entre outros, espectros de agentes dopantes presentes em vários medicamentos. Os dados são comparados com a medicação declarada pelos atletas e com os resultados obtidos através das metodologias complementares. Se os “picos desconhecidos” não são identificados, obtém-se dados complementares através de derivações com anidrido acético ou anidrido trifluoroacético, sendo os espectros obtidos comparados com os espectros de massas relevantes. Procede-se, em seguida, a uma confirmação por comparação com espectros de massas de compostos de referência ou de amostras de urina fisiológicas.

Caso não seja possível a sua identificação, a informação obtida na análise dos “picos desconhecidos” é conservada numa base de dados especial.



Serão apresentados exemplos de “picos desconhecidos” detectados no Laboratório, cuja identidade foi posteriormente encontrada por meio desta estratégia.

O-11. Separation of Fragrant Compounds from Geranium Essential Oil Using Liquid Chromatography

Paula B. Gomes, Vera G. Mata, Alirio E. Rodrigues*

LSRE – FEUP, Porto, Portugal

ABSTRACT

In this work, experimental data was obtained for the separation by HPLC of geraniol and citronellol, two high-added value fragrant compounds existing in geranium oil. This was carried out using a HPLC column and microcrystalline cellulose triacetate (CTA) as stationary phase. This packing material is here used in a new area of application that is the separation of terpenic alcohols from Flavour and Fragrances essential oils.

INTRODUCTION

Geranium plant exists abundantly in Portugal and its essential oil is the usual source of geraniol and citronellol natural fragrant chemicals - two high-added value compounds in the perfumery industry, used to impart a flowery and sweet-rose like scent, respectively. In the present work the separation of the terpenic alcohols geraniol and citronellol was performed using a HPLC column packed with microcrystalline cellulose triacetate (CTA), being a new application of this material in the area of Flavours and Fragrances. CTA is mainly employed in pharmaceutical applications for separation of chiral components [1,2]. This material is used for the separation of a broad range of different classes of organic compounds containing carbonyl, hydroxide, ether or amine functional groups [3]. The highest selectivity factors in this material are found when using ethanol as the eluent [1], which is also the most suitable solvent for the separation of solutes with flavour and fragrance applications, as well as cheap and non-toxic.

This paper reports the experimental determination of adsorption equilibrium isotherms and efficiency curves for both key components of geranium essential oil.

METHODS AND MATERIALS

All the experiments were performed in a Gilson 302 HPLC unit, with a Gilson 115 UV detector ($\lambda = 210$ nm). The HPLC column used is $\frac{1}{4}$ in OD (4.6 mm ID) and 250 mm length, filled in our laboratory using Alltech HPLC column slurry packer equipment. The packing consists in 20 μm CTA (Merck) particles, in an ethanol suspension.

The HPLC analyses were performed using ethanol 100% as the mobile phase. There were made 20 μL pulse experiments with ethanolic solutions of pure components geraniol (Sigma) and citronellol (Fluka), at different flow rates (0.19, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 and 1 ml/min).

RESULTS

The adsorption equilibrium isotherm constants were determined assuming that both components have linear adsorption response behaviour, by:

$$\bar{t}_{R_i} = \frac{\varepsilon V_c}{Q} \left(1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} K_i \right) \quad [1]$$

where \bar{t}_{R_i} is the retention time, $\varepsilon=0.4$ is the bed porosity, V_c is the column volume, Q is the fluid flow rate and K_i is the slope of linear adsorption isotherm for compound i (Fig. 2).

A good linearity of HETP vs. fluid velocity was verified for pure geraniol and citronellol (Fig. 3). Since HETP values are larger for geraniol, this must be considered as a reference in a future evaluation of the column geometry.

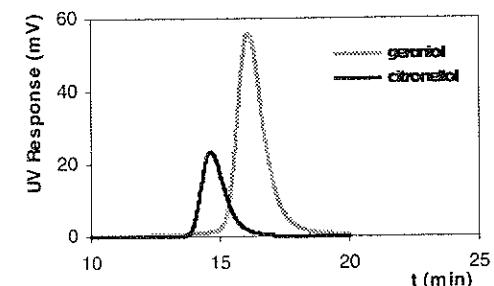


Fig. 1. Pulse responses for geraniol and citronellol.

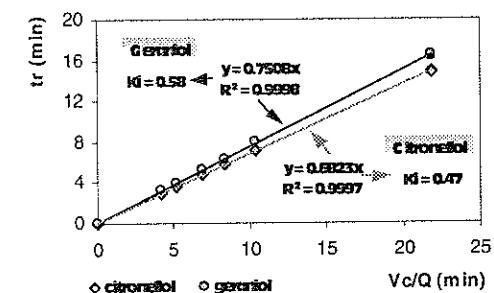


Fig. 2. Curve fittings used for the isotherm

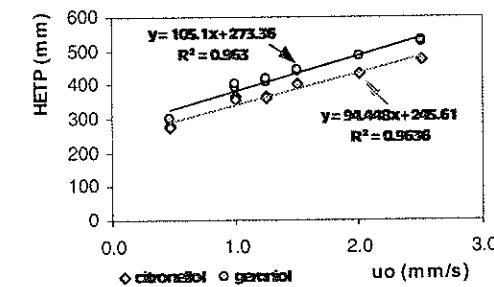


Fig. 3. HETP curves for geraniol and citronellol.

CONCLUSIONS

The linear isotherm coefficients were determined to be $K_{GER} = 0.58$ and $K_{CIT} = 0.47$ for geraniol and citronellol, respectively. This data will be used for design and optimisation of this binary chromatographic separation, namely for preparative HPLC and SMB.



BIBLIOGRAPHY

- [1] B. Sellergren in G. Subramanian (Ed.), A practical approach to chiral separations by liquid chromatography, VCH, Weinheim (Germany), 1994.
- [2] Pais,L.S.; Loureiro,J.M.;Rodrigues,A.E., Separation of Enantiomers of a Chiral Epoxide by Simulated Moving Bed Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 827, 215-233 (1998b).
- [3] Merck Chromatography web site (<http://www.chromatography.co.uk>)

**O-12. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Headspace SPME Analysis in a Wine Model**

Sílvia Rocha; V. Ramalheira; A. Barros; I. Delgadillo and M. A. Coimbra
Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro,
Scarrico@dq.ua.pt

Solid phase microextraction (SPME) is a sample preparation technique based on sorption (absorption and/or adsorption, depending on the fiber coating), which is useful for extraction and concentration analyses either by submersion in a liquid phase or by exposure to a gaseous phase (1). SPME first application was the evaluation of pollutants in water (2). Since then, SPME has been used in a range of fields, including wine (3-6). These studies aim the characterisation/distinction between the different varieties and the following of a specific step of wine making, where variation of the matrix composition occurs. However, the extent of this variation in the amount estimated by the SPME technique is usually not considered. In order to clarify the extent of the changes in the concentration of one matrix component on the headspace equilibrium and, consequently, in the SPME sorption of the other liquid matrix components, variations in the concentration of each standard were analysed.

Headspace SPME sampling and chromatographic parameters were optimised for nine common wine flavour compounds in 10% (v/v) aqueous ethanol: linalool, nerol, geraniol, 3-methyl-1-butanol, hexanol, 2-phenylethanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate. A SPME fiber coated with 85 • m polyacrylate (PA) was used. The chemical groups (monoterpeneoids, aliphatic and aromatic alcohols, and esters) showed characteristic behaviour in SPME analysis. The relative response factors (RRF), that establish the relation between the concentration of the compound in the matrix liquid solution and the GC peak area, were estimated for all compounds. The RRF is considered to be result from the characteristics of each compound, such as its molecular weight, boiling point, molecular structure, solubility in the liquid matrix and affinity to be absorbed to the fiber coating and FID response. The $\text{Log}_{10}(\text{RRF})$ varied from 0 (3-methyl-1-butanol) to 3 (ethyl decanoate), according to their molecular weight (7).

The results show that, in general, the increase of the concentration of one compound results in a decrease of the absorption of all the others. In order to verify the statistical relevance of this effect, a t-student test was applied to all liquid matrices used, with multiplication of the concentrations by factors ranging from 0.2 to 14. This effect becomes statistically significant when the variations in concentration increased. The most influenced compounds by the variation of the relative matrix composition were 3-methyl-1-butanol and hexanol, both with lower RRF values. On the contrary, ethyl decanoate was not influenced by the variations in the concentration of the other compounds, which may be explained by its high affinity to the fiber, reflected in the higher RRF value. These results show that the compounds with higher RRF were less influenced by the matrix composition. The quantification by SPME was shown to be highly dependent on the matrix composition.

Experiments on 4 different monovarietal Bairrada white wines (Arinto, Bical, Cerceal and Maria Gomes varieties) were carried out. These results showed that SPME can be used for the analysis of the wine volatile compounds provided the effect of its relative composition is taken in consideration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the financial support of PAMAF (Project 6039), and the Research Unit 62/94, QOPNA. We thank Professor J.J. Teixeira Dias (University of Aveiro) for the helpful scientific discussions and Eng. A. Dias Cardoso (Estação Vitivinícola da Bairrada) for providing the monovarietal wines.

-
- (1) Arthur, C. L.; Killam, L. M.; Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1960-1966.
 - (2) Belardi, R. P.; Pawliszyn, J. B. *Water Pollut. Res. J. Can.* 1989, 24, 179-191.
 - (3) Garcia, D.; Magnaghi, S.; Reichenbächer, M.; Danzer, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.* 1996, 19, 257-262.
 - (4) Garcia, D.; Reichenbächer, M.; Danzer, K. Analysis of wine bouquet using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 1998, 21, 373-377.
 - (5) Fischer, C.; Fischer, U. Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1995-1997.
 - (6) Vas, G. Gál, L.; Harangi, J.; Dobó, A.; Vékey, K. Determination of volatile aroma compounds of Bläufrankisch wines extracted by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 1998, 36, 505-510.
 - (7) Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. SPME Analysis of Flavor Compounds in a Wine Model. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Retention Factors. *J. Agric. Food Chem.* 2001, in press.

O-13. Optimização e Validação da Análise de Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares em Águas por HPLC com Detector de Fluorescência e Diode-Array, utilizando como Método de Preparação da Amostra a Extração Líquido-Líquido

ALEXANDRE RODRIGUES^a, VITOR VALE CARDOSO^a, ELISABETE RODRIGUES^a, MARIA JOÃO BENOLIEL^a

^aLaboratório Central da EPAL, Rua do Alviela, 12, 1170 Lisboa, Portugal

A determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (HAPs) tornou-se muito importante em laboratórios de controlo de qualidade de águas. A nova Directiva comunitária 98/78/EC transposta para o DL 243/2001 de 5 de Setembro estabelece que se deve monitorizar estes parâmetros em águas para consumo de humano, devendo respeitar o valor paramétrico referido no Anexo I (menos de 0,10 µg/L para a soma das concentrações dos compostos benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]períleno e indeno[1,2,3-cd]pireno). A análise destes compostos foi optimizada por HPLC com detector de fluorescência e com detector de diode-array tendo sido também aplicada para além dos compostos atrás mencionados, à análise do seguintes HAPs: naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenanreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno e dibenzo[a,h]antraceno. Com o objectivo de optimizar as condições de detecção dos HAPs analisaram-se os espectros de excitação e emissão obtidos para cada composto no detector de fluorescência (FLD) e os espectros de absorção obtidos com o detector de diode array (DAD). A utilização de detector de fluorescência na análise deste tipo de compostos permite atingir limites de detecção bastante mais baixos em comparação com os obtidos pelo DAD (limite de detecção do benzo[a]pireno por DAD 2,5 µg/L; por Fluorescência 0,009 µg/L). Para ambos do detectores observou-se a existência de linearidade, nas gamas de concentração estudadas, para os 16 HAPs, não se tendo obtido nenhuma recta com coeficiente de determinação inferior a 0,999.

A análise dos HAPs requer a utilização de um método de preparação da amostra para que se torne possível atingir os limites impostos na legislação, sendo o método tradicionalmente utilizado uma extração líquido-líquido seguida por outras etapas como evaporação/concentração e limpeza. Através de ensaios interlaboratoriais concluiu-se que este métodos de preparação da amostra acoplado ao HPLC com FLD e



DAD, permite obter resultados de exactidão muito satisfatórios para os HAPs nas condições estudadas.



O-14. Headspace Solid Phase Microextraction Use for the Characterization of Volatile Compounds in Olive Oils

L. H. Ribeiro, A. M. Costa Freitas, M. D. Gomes da Silva

Departamento de Química, Centro de Química Fina e Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-114 Monte de Caparica, Portugal.

Solid phase microextraction (SPME) is a fast and simple sampling method for analysis of volatile compounds. The method is based on the different equilibrium established between the sample and its headspace, and between the headspace and a fiber coated with appropriate coating material. In the last years SPME has been used with great success for the analysis of different compounds mainly from aqueous matrixes. Although some work has already been done with different matrixes, little is done for the analysis from a lipid matrix as the olive oil. Being the study of olive oils volatile composition a very important issue in food quality control, the development of a method capable of doing this task in a fast and easy way is of great relevance.

We present here preliminary results obtained when SPME is used as sampling device for the analysis of aroma compounds from an olive oil matrix, with two different fiber coatings polyacrylate (PA) and polydimethylsiloxane (PDMS), followed by the analysis of the extracted sample by GCMS.

Sampling time as well as fiber coating are very important parameters to be controlled when using SPME as sampling device for GC analysis. Both conditions affect the response given by a target volatile compound and the result changes depending on compound class and volatility.

The tests so far done seem to show that sampling time is able to affect sensitivity for compounds of high boiling point but has an opposite effect for low boiling point compounds. Fiber coating, on the other hand is crucial depending on compounds chemical structure. PA fiber revealed higher recovery for the more polar compounds as expected.

When equilibration time is fixed sampling time did not seem to affect the ratio of extracted compounds. On the other hand, when absolute areas are used time affects

extraction recovery and equilibrium is not obtained until 60 minutes extraction time, for the same equilibration time. If adsorption equilibrium was reached, that would mean that the highest sensitivity for an analyte was attained. Since this was not the case, up to 60 minutes, to avoid excessive analysis time a mathematical treatment, proposed by others, of the adsorption process was applied that allows quantification before equilibrium is reached.

The theoretical model was fitted with experimental data, and a good agreement between both was found.

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

O-15. Aplicação de SPME/GC-MS na Determinação do Aroma Varietal em Vinhos Madeira

J. S. Câmara^a; J. C. Marques^a; M. A. Alves^b

^aDepto. de Química da Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal,

^bDepto. de Eng^a Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto

1. INTRODUÇÃO

O aroma varietal de um vinho é composto por substâncias voláteis sob a forma livre, odorante, directamente acessíveis à mucosa olfactiva, e sob a forma de percursos, ligados, não odorantes. A forma livre é constituída essencialmente por monoterpenóis (linalol, α -terpineol, citronelol, nerol, geraniol, ...), conferindo uma certa tipicidade a uma determinada variedade de uvas. Uma fracção importante do aroma encontra-se na forma ligada, não odorante, designada de percursos, porque susceptíveis de serem transformados em compostos voláteis aromáticos. Estes percursos são polióis monoterpénicos (transformam-se ao pH dos mostos e vinhos em compostos odorantes como o Hidroxi- α -nerol e óxido de nerol), glicósidos terpénicos (açúcares ligados pelo carbono anomérico a um terpenol) e derivados glicosilados carotenóides.

Com este trabalho pretendeu-se *identificar e quantificar* os monoterpenóis livres dos vinhos *Verdelho* e *Malvazia*, duas das principais castas nobres da Região Demarcada da Madeira. Estes compostos estão associados à tipicidade dos vinhos e devido ao seu aroma floral podem ter um papel determinante no aroma dos vinhos de castas neutras.

Para tal recorreu-se à SPME (*microextração em fase sólida*) em modo "headspace" (HS-SPME) para isolar, e ao GC-MS para separar, identificar e quantificar os analitos de interesse. A SPME tem sido uma técnica amplamente utilizada nos últimos anos para a análise de compostos de diferentes polaridades e volatilidades em variadas matrizes. No entanto é uma técnica bastante sensível às condições experimentais e à composição da matriz pelo que requer cuidados adicionais quando se pretende utilizar para fins quantitativos.

Estudaram-se as condições óptimas para a HS-SPME usando soluções etanólicas a 18% dos monoterpenóis, tendo sido avaliados os factores com influência no processo de extração, tais como: *o tipo de fibra, a temperatura de extração, o tempo de*

amostragem, o pH, o teor em etanol, a força iônica, o tempo e temperatura de desadsorção. Foi ainda realizada a validação do método para as condições óptimas de operação.

2. Resultados

Foram analisados vinhos da colheita de 1999 das castas Verdelho e Malvazia, com as seguintes condições experimentais: fibra, PA-85µm; volume de amostra, 2,4 ml (vial de 4 ml); temperatura do ensaio, 40°C; pH=3,5; teor de NaCl, 30% (m/v); tempo de equilíbrio, 120 min. em modo “headspace”; temperatura de desadsorção, 6 minutos a 250 C.

A análise por GC-MS foi efectuada num Saturn 3 Varian, equipado com um detector de massas de armadilha de iões. Como gás de arraste foi utilizado o He (N_{60}) a uma pressão de 13 Psi, correspondendo a um fluxo de, aproximadamente, 1 mL/min. A coluna capilar utilizada foi uma Stabilwax (d.i.= 0,25mm, d_f = 0,25 µm, L = 30 m).

Todas as análises foram efectuadas no modo “scan”, com ionização por impacto electrónico.

Na figura 1. está representado um cromatograma de corrente iônica total de uma solução padrão dos terpenóis em estudo, e na figura 2. as concentrações de alguns dos monoterpenóis em estudo nos vinhos *Verdelho* e *Malvazia*.

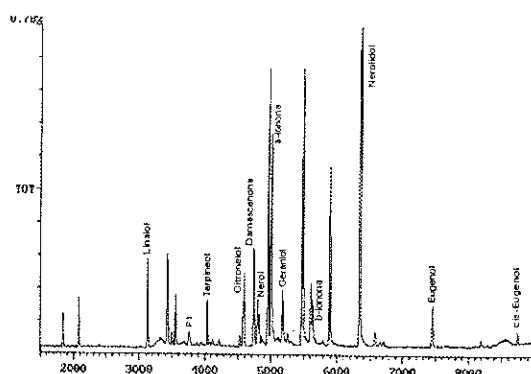


Fig. 1. Cromatograma de corrente iônica total de uma solução hidroalcoólica a 18% dos monoterpenóis extraídos por HS/SPME com fibra PA-85µm durante 120 min..

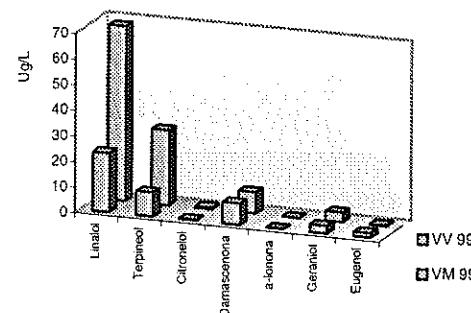


Fig. 2. Comparação da concentração de alguns monoterpenóis nos vinhos Verdelho e Malvazia.

COMUNICAÇÕES EM PAINEL

CROMATOGRAFIA GASOSA



P-1. Licor de Murta: Contributo para o Conhecimento da Evolução de Compostos Terpénicos

L.R. Galego¹, F.J. A. Bento¹, V.R. Almeida,^{1,2}, M.R. Bronze^{2,3}, L. Vilas Boas^{2,4}

¹Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8000 117 Faro

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras

³Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1600 Lisboa

⁴Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1096 Lisboa

A murta, *Myrtus communis* L., da família das mirtáceas é um arbusto espontâneo nos países de clima mediterrânico. No barrocal algarvio sobretudo junto das ribeiras, encontram-se muitos destes arbustos. Tradicionalmente usavam-se as bagas deste arbusto para a produção de licores e xaropes.

A caracterização química de frutos e folhas da murta, bem como dos óleos essenciais delas extraídos e propriedades antioxidantes que lhe são inerentes, têm sido objecto de vários estudos [1-2].

METODOLOGIA

Foi feita a maceração de bagas de murta durante 10 dias em aguardente de figo. Após filtração, foi adicionado ao macerado um xarope de açúcar seguindo-se um período de maturação. Analisaram-se amostras de licores após 3, 6 e 30 meses da preparação.

Para analisar os componentes voláteis das amostras (10mL em frascos de 20mL), utilizou-se microextracção em fase sólida (MEFS) usando fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno e divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano expostas no espaço de cabeça durante 35 minutos com agitação a 1600 rpm.

A análise por GC-MS foi feita num sistema ShimadzuQP-5000 usando uma coluna J&W 1701P de 30 m.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando os perfis de voláteis obtidos com qualquer das fibras de MEFS utilizadas, observa-se que após 30 meses de preparação do licor há uma redução ou mesmo desaparecimento dos compostos • -pineno (11,14 min), 3-careno (11,55 min), • -pineno (13,01) e acetato de 4-tujeno (24,50 min) conforme se pode observar na figura.

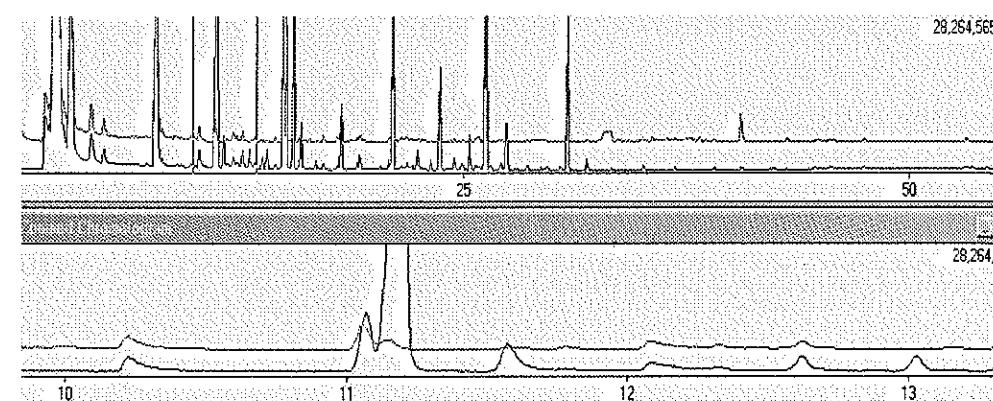


Fig.: Cromatogramas de licor de murta 3 meses (inf.) e 30 meses (sup.) após a preparação

Os quatro compostos referidos são monoterpenos bicíclicos tendo um anel ciclobutano (α -pineno e β -pineno) ou ciclopropano (3-careno e acetato de 4-tujeno) em tensão e isso poderá explicar o desaparecimento destes compostos ao longo do tempo uma vez que os anéis referidos têm tendência para abrir originando uma diversidade de terpenos monocíclicos ou acíclicos [3].

Usando as mesmas metodologias de análise, estão a ser comparados os extractos preparados com aguardente de figo que tradicionalmente é utilizada na preparação de licores e soluções hidroalcoólicas com igual teor de etanol a fim de avaliar se os outros componentes da aguardente influenciam a extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. R. Galego, M. R. Bronze, V. R. Almeida, L. Vilas Boas, Contribution of the Chemical Characterisation of Myrtle Liqueur, Actas do 2º Simpósio In Vino Analytica Scientia, Bordeaux, 2001, 184.
- [2] G. Pirisino, A. Mule, M. D. L. Moretti, M. Satta, Yield and chemical composition of essential oil from self-sown *Myrtus communis* L. from Cuglieri (Sardinia). *Riv. Ital. EPPOS*, 1996, 9 (19): 159–169, *in Chem. Abst.*, 127:252945j.
- [3] W. Cocker, P. V. R. Shannon, P. A. Staniland, (1967), *J. Chem. Soc. (C)*, 915.

P-2. Simultaneous Determination of Target Analytes From Four Groups of Pesticides in Water Samples Using a Bipolar SPME Fibre and GC-MS

C. Gonçalves¹ and M. F. Alpendurada^{1,2} *

¹ Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy of Oporto University
Rua Aníbal Cunha, 164 / 4050-047 Porto, Portugal

² IAREN - Water Institute of the Northern Region
Rua Aníbal Cunha, 164 / 4050-047 Porto, Portugal

* Corresponding author

Abstract

Pesticide residue analysis in environmental samples has received increasing attention in the last few decades.

In addition to the most currently used pesticides also the former very persistent compounds must be analysed, in compliance with the water quality legislation.

A multiresidue method suitable for quantitative and confirmatory analysis of organochlorine, organophosphorous, triazine and pyrethroid pesticides is presented. Trace level determination of these compounds requires extraction and concentration steps, here carried out by solid-phase microextraction using a porous polymer sorbent. The mixed phase PDMS/DVB coating was selected due to its ability to extract analytes bearing a wide range of polarities.

The procedure involves a 60-min extraction at controlled temperature and agitation conditions followed by gas chromatographic separation and mass spectrometric detection, taking advantage of its selectivity and sensitivity in environmental analysis.

Limits of detection below the regulatory limit of 0,1 µg/L for individual pesticides in water samples were achieved for the majority of analytes.

Parameters concerning SPME optimization and method validation for drinking water and groundwater analysis will be given.



P.3. Aplicação da Técnica de “Purge & Trap” à Análise de Compostos Voláteis do Aroma do Queijo

Ana Filipa Xavier, Ana M. Partidário

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

INTRODUÇÃO

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na extracção e concentração de compostos voláteis do aroma de produtos alimentares. Destacam-se as que incidem na análise do espaço de cabeça (fase de vapor), pela vantagem comum de não utilizarem solventes orgânicos na extracção. No espaço de cabeça estático (static headspace), atinge-se um equilíbrio termodinâmico entre a fase líquida ou sólida da amostra e a respectiva fase gasosa. Consequentemente a detecção dos compostos voláteis depende de vários parâmetros, tais como: a concentração do composto e a sua pressão de vapor, a matriz da amostra e a temperatura (Hachenberg, 1983). No espaço de cabeça dinâmico (dynamic headspace - DHS), os compostos voláteis são continuamente libertados e arrastados por um gás inerte e concentrados numa armadilha, da qual são posteriormente desorvidos para análise cromatográfica. A microextracção em fase sólida (SPME), utiliza fibras que concentram por adsorção os voláteis, e tem vindo a revelar-se eficaz no estudo de compostos voláteis, dada a sua simplicidade. No entanto, Elmore (1997) refere algumas dificuldades desta técnica, tais como a sua aplicação a amostras sólidas e a análise de compostos em quantidades vestigiais ou com elevado grau de volatilidade. Este autor refere ainda a possibilidade da introdução de artefactos.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver e aplicar a técnica DHS, ao estudo dos compostos voláteis de um produto alimentar, queijo de vaca curado de pasta dura, utilizando o sistema automático de concentração de voláteis (Purge/Trap). Este requer pequenas quantidades de amostra, tem um período de tempo para análise relativamente pequeno, sendo ainda adequado à análise de amostras sólidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Foram analisadas 41 amostras de queijo de vaca de pasta dura, previamente congeladas e reduzidas a pó antes da sua introdução no frasco do concentrador. Após a extracção e concentração, os compostos voláteis foram separados e identificados por cromatografia



em fase gasosa e detector de ionização de chama (GC/FID). A identificação de um total de 33 picos, realizou-se pela injecção de soluções de padrões puros nas mesmas condições de análise, para os quais se calcularam os respectivos tempos de retenção relativos (trr) ao padrão interno (3-metil hexanona-2). Os padrões foram ainda adicionados a amostras já extraídas, tendo sido confirmados os trr.

Foi determinada a repetibilidade das áreas obtidas no sistema GC/FID, com injecção manual, e para diferentes concentrações. O desvio padrão relativo (RSD) variou entre 1,9 e 20%. Na avaliação da repetibilidade da injecção pelo sistema Purge/Trap, obtiveram-se valores de RSD entre 0,7 e 14%.

O método mostrou-se linear numa gama alargada de concentrações, com R^2 de 0,998 (Purge/Trap-GC-FID) e de 0,997 (GC-FID).

Pela comparação entre os valores das áreas obtidas, para 5 diferentes concentrações, por injecção directa no GC e injecção no Purge/Trap, verificou-se a existência de percas, inferiores a 10%, no processo de introdução da amostra no concentrador.

Na avaliação da exactidão do método foi calculada, para cada um dos 9 compostos voláteis constituintes de uma mistura padrão, a recuperação obtida após adição a queijo. O efeito negativo da matriz da amostra na extracção é bastante variável com o tipo de composto, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 37 e 97%. Avaliou-se também o efeito específico da fração lipídica, na retenção dos compostos voláteis da mesma mistura padrão, a qual foi, para o efeito, adicionada a leite magro. Obtiveram-se percentagens de recuperação bastante superiores para os constituintes que apresentavam valores mais baixos na matriz queijo.

BIBLIOGRAFIA

- Elmore, J. S. et al (1997), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2638-2641
Hachenberg H. e Schimdt A. P., “Gas Chromatographic Headspace Analysis”, John Wiley & Sons

P-4. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation

L. Fernandes, A. Relva e A. M. Costa Freitas

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

Malolactic Fermentation (MLF) is necessary for the aging of red wines and also for certain white wines. Indeed, the bacterial activity plays a role in the stabilization of wines and ensures a decrease in acidity and an enrichment of aromatic composition. The importance attached to the organoleptic contribution of fermentation varies according to authors. In fact some authors pointed out the main role of bacteria in the observed changes of sensorial impact; Others clearly show that modifications observed are associated only to vine edaphoclimatic conditions.

In Portugal, due to climatic conditions, MLF is usually spontaneous. The present research concerns experiments carried out in 1999 in the Dão region to investigate the influence of MLF on the CH_2Cl_2 wine extracts at "key turn points" of MLF.

Among the products of the various reaction which occur during MLF, only the compounds with lactic or buttered-like odors such as diacetyl or lactic acid esters have been well studied. These compounds, diacetyl, and ethyl lactate, along with the ratio Malic acid/Lactic acid were used to establish "key turn points". From ethyl lactate the enantiomeric ratio was also monitored.

Wine vinification was followed at SOGRAPE. Two red wines were followed. At the end of alcoholic fermentation wines were divided into two stainless steel containers. In one container MLF was suppressed by addition of 50mgL^{-1} of SO_2 . The other container followed spontaneous MLF. Samples were taken daily until no further activity was detected. SO_2 was added to each collected sample and they were stored at 4°C .

The values of enantiomeric ratio found for (*R,S*) ethyl lactate agree with the fact that MLF have been carried out by spontaneous infection. The concentration of (*R,S*) ethyl lactate rose continuously along MLF.

During MLF diacetyl raises 3 to 4 times its initial amount, passing through a maximum where its amount is almost 20 to 35 folds the sensory reported threshold. At the end of

MLF, when the ratio lactic/malic acid stabilizes, the amount of diacetyl decreases to a lower value although it stills above the limit of the reported sensory threshold.

The CH_2Cl_2 extracts GC patterns were determined at the change points of MLF. Semiquantitative results obtained revealed a similar trend as diacetyl with a maximum at the middle of MLF. No significant quantitative changes were observed at the end of MLF for most of the monitored compounds, exceptions were isoamyl alcohol and monoethyl succinate that revealed a slight increase and 3-hydroxy-butane-3-one which raised almost 4 times the value determined at the end of alcoholic fermentation.

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

P-5. Enantiomeric Ratio of Chiral Compounds During Malolactic Fermentation in Portuguese Wines

L. Fernandes, A. Relva A. M. Costa Freitas e M. D. Gomes da Silva

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

Malolactic Fermentation (MLF) is known as wine second fermentation. Lactic bacteria are the agents responsible for this fermentation in which L-malic acid is transformed in L-lactic acid and CO₂. The direct consequence of MLF is wine deacidification. MLF is also responsible for wines biologic stabilisation and "flavour" modifications.

The role of MLF in wine sensorial properties has been subject of several studies. Nowadays it is generally accepted that MLF has a direct influence in some specific attributes as well as in the presence of completely different odours and tastes.

The objective of this work is the study of wines CH₂Cl₂ extracts composition along MLF with special emphasis in the enantiomeric contribution of chiral compounds.

The work has been oriented with the objective of identifying most of the compounds present even in small amounts. To accomplish this task the CH₂Cl₂ extract, obtained by ultrasonication, was pre-fractionated by HPLC. Samples of the beginning middle and end of MLF were extracted. After concentration these extracts were pre-fractionated by HPLC. Fractions were collected every 2 minutes. After concentration each fraction was analysed by GC MS. Identification was made by library search and standard comparisons. As an example the chromatogram of ethyl-3-hydroxybutyrate is shown. This compound appears at all stages of MLF. Its enantiomeric ration was determined by chiral chromatography.

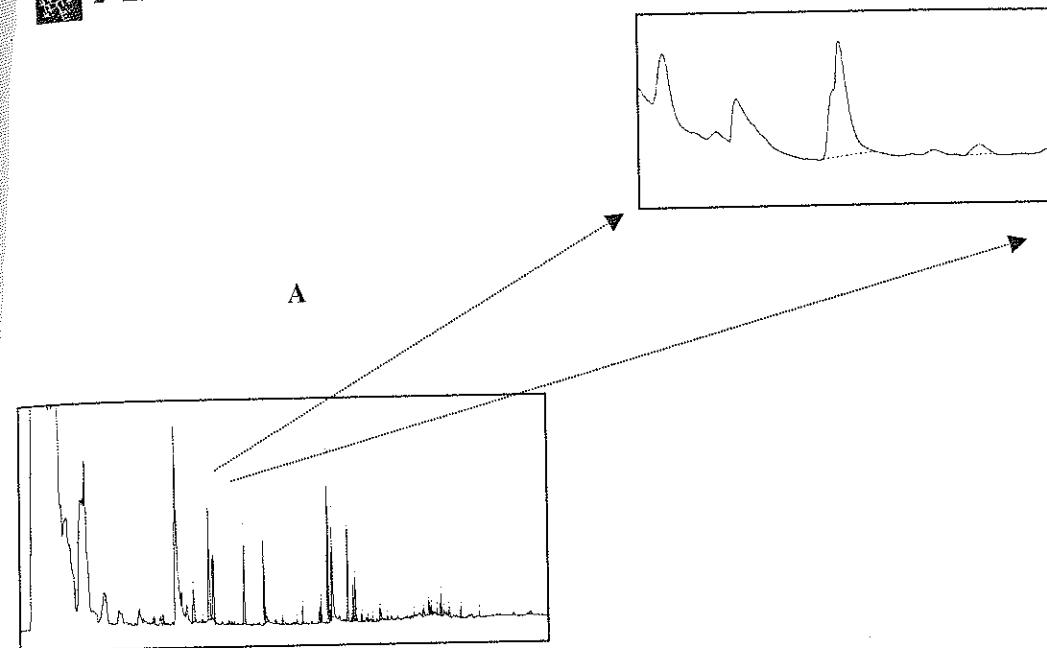


Figure 1: Identification of 3-hydroxi-ethyl butyrate; A - Chromatogram of Fr12 (04-11-99) using a capillary column coated with a 0.25 • m film of 15% heptakis-(2,3-di-O-methyl -6-O-butyldimethylsilyl)-• -cyclodextrin in SE52 Chromatographic conditions: 50°C for 3 minutes ; 2°/min until 210°C. Hold for 15 minutes; B- Enlargement of retention time slice 30-35 minutes

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

P-6. Improvement of The Detection Limits for Wine Aroma Compounds Determination

L. M. T. Vaz-Freire, A. Relva e A. M. Costa Freitas

Departamento de Química, Centro de Química Fina e Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-114 Monte de Caparica, Portugal.

The aroma of wines consists of 600 to 800 aroma compounds from which especially those, typical of the variety, are already present in the grapes. The essential part of the wine flavour is formed during alcoholic fermentation. Apart from glycerol and ethanol, as well as diols and higher alcohols, numerous other wine constituents are formed by yeast metabolism. Ethyl esters of straight chain fatty acids and acetates of higher alcohols are the dominating esters in wine and they are formed during alcoholic fermentation. These compounds can contribute to the evaluation of optimal wine technology, but are, however, not suitable for a variety characterisation.

Microrganisms are also able to synthesise terpene compounds, but the formation of terpenes by *Saccharomyces* crevasses has not yet been observed. The monoterpane compounds are typical primary aroma components and are therefore suitable for varietal characterisation. The aim of this work was to develop a method capable of evaluating wine technology as well as terpene composition, thus varietal classification.

Solid phase microextraction (SPME) is a fast and simple sampling method for analysis of volatile compounds, in previous work we reported method optimisation for SPME analysis of wine aromas, however, if the aim is terpene analysis care must be taken on the method detection limit since terpene are usually found in wines in very small amounts.

In this work we compared the detection limits obtained with three different detection modes: FID, MS-Scan mode and MS- SIM mode, for SPME-GC analysis.

The results obtained clearly show that when MS-SIM mode is used detection limits lower for a factor of almost 100 for terpenes used. Between FID and MS-scan mode differences are not so dramatic. To improve peak identification retention index were determined for all compounds studied.

When the method was applied to wine-must extracts obtained after CO₂ extraction along alcoholic fermentation, terpenes amounts were only possible to be determined if SIM mode GCMS was used for detection.

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

P-7. CHARManalysis™ – Uma técnica de Avaliação dos Odorantes – Chave de Alimentos

Virgílio Falco¹, Arlete Mendes Faia¹, Maria Cristina Clímaco²

¹ Departamento de Indústrias Alimentares, UTAD, 5001 Vila Real.

² Estação Vitivinícola Nacional, INIA, 2565-191 Dois Portos.

Os trabalhos de investigação realizados no período inicial de estudo do aroma dos alimentos baseavam-se no pressuposto de que todos os compostos voláteis presentes nas amostras contribuem para o aroma. Estes trabalhos tiraram grande partido do desenvolvimento de técnicas adequadas à separação e identificação de compostos voláteis, como a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (HRGC-MS). O procedimento analítico limitava-se à identificação dos compostos voláteis extraídos das amostras, que apareciam como picos no chromatograma.

Milhares de compostos voláteis foram assim identificados. Porém, alguns investigadores lançaram dúvidas se todos estes compostos contribuíam de facto para o aroma. As dúvidas aumentaram quando se passou a determinar os valores de actividade odorífera (OAV, Odor Activity Value) dos compostos voláteis, em termos da razão entre a concentração do odorante no alimento e o limiar de percepção olfactiva do composto. Por exemplo, Guth [1] determinou os OAVs de 44 compostos voláteis presentes em vinhos brancos das castas Scheurebe e Gewürztraminer e verificou que apenas 8 destes compostos contribuíam intensamente para o aroma dos vinhos analisados.

O reconhecimento de que nem todos os compostos voláteis presentes num alimento contribuem para o aroma foi o motivo para alterar a metodologia de análise. Desde meados da década de 80 que o grupo de Terry Acree, da Universidade de Cornell (Geneva, EUA) tem vindo a utilizar a técnica de CharmAnalysis™ para a identificação dos compostos com OAVs mais elevados que contribuem para o aroma dos alimentos [2]. A CharmAnalysis™ combina a HRGC, para separação dos compostos voláteis extraídos de uma amostra, com a olfactometria, para detectar a actividade odorífera dos voláteis [3].

Esta técnica e outras similares têm permitido a preparação de soluções sintéticas com aromas muito semelhantes ao aroma original dos alimentos. Além disso, o recurso

subsequente a ensaios de omissão tem permitido determinar as interacções entre os diversos compostos voláteis na mistura.

Pretende-se apresentar o estudo de odorantes-chave de alimentos por CharmAnalysis™, discutindo as suas potencialidades e limitações.

Referências bibliográficas

1. Guth H, (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45: 3027-3032.
2. Acree T.E., J. Barnard, D.G. Cunningham, (1984) *Food Chem.* 14: 273-286.
3. Acree T.E., J. Barnard, (1996) A Tutorial for CharmAnalysis™ – a Method for the Measurement of Odor. DATU, Geneva NY.

P-8. Characterization of Olive Oil, With Different Attributes, by its Volatile Compounds Pattern

Laila H. Ribeiro¹, A. M. Costa Freitas¹ M. D. R. Gomes da Silva¹ and J. M. Baptista Gouveia²

¹ Departamento de Química, Centro de Química Fina e Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-516 Monte de Caparica, Portugal

²Departamento Agro-Indústrias e Agronomia Tropical, SCTA-LET, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex

Olive oils obtained from fresh olives have a pleasant flavour, related to their volatile compounds composition.

Whenever olive fruits are not processed immediately after harvest a storage period is needed. During storage moulds and yeasts can develop and their metabolism will result in the development of off-odours with a consequent loss of quality.

Organoleptic properties of olive oils are an important quality criteria. European Communities regulations (EC) includes sensory attributes and related vocabulary to qualify olive oil flavour.

In this study olive oils with four different attributes , fruity, bitter, tulha and mouldy, were analyzed to identify is volatile patterns as well as the compounds that might be responsible for these attributes. Statistical methods were applied to cluster the volatile compounds.

Attributes characterization was done by submitting the olive oils to a pannel characterization.

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

P-9. Extraction of Olive Oil Volatiles with Two Different Adsorbents and Minimum Breakthrough

Laila H. Ribeiro, A. M. Costa Freitas and M. D. R. Gomes da Silva

Departamento de Química, Centro de Química Fina e Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-516 Monte de Caparica, Portugal

Quantitative adsorption studies are usually carried out by means of pure standards. Breakthrough volumes obtained by this way may be irrelevant in the case of complex mixture due to displacement processes.

The retention behaviour of some olive oils volatiles was studied using two glass tubes connected in serie, packed with adsorbent.

When multi- sorbent trapping, displaced compounds are re-trapped on the second tube and therefore retained for desorption.

The proportions of collected headspace volatiles may change when different adsorbing materials are used, depending on the active surfaces and the different selectivities of the porous material used.

Two different adsorbents were used: Tenax and activated Charcoal. Model standard solutions were prepared. The goal is the achievement of improved selective trapping of the volatiles used with a minimal breakthrough.

Model solutions were prepared having in mind a diversified chemical nature. Each tube used was analyzed separately. Extractions times of 15, 30 and 60 minutes were evaluated.

Figure 1 shows the results obtained with both adsorbents with 60 minutes extraction time.

It is clear that compounds are mainly retained at the first trap, however adsorption is dependent on the concentration. Tenax shows a lower retention power. In fact when 400 ppm solutions were used and Tenax was the adsorbent, several compounds were collected on the second tube. With this concentration Charcoal was still able to retain the sample at the first tube with no loss.

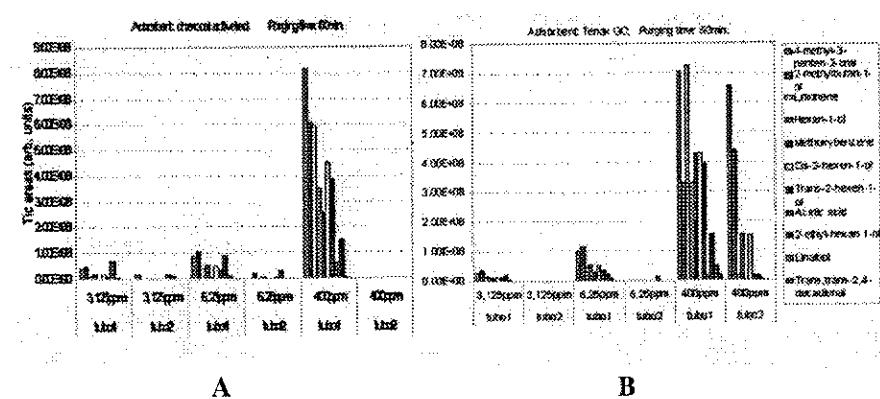


Figure 1 – Extraction % of the model solutions of different concentration using Activated Charcoal (A) and Tenax (B) as Adsorbents. Evaluation of adsorption efficiency.

Work supported by PRAXIS P/AGR/11116/98

P-10. Phenolic Compounds and Antioxidants Activity in Medicinal Plant Extracts

Suzana Palhais¹, Cristina M. L. Silva^{1,2}, M. Lurdes Mira^{1,3} Alda Pereira da Silva³ and M. Helena Florêncio^{1,2}

4. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, Bloco C8 Piso 6 Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal
5. Centro de Espectrometria de Massa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Bloco C8 Piso 6, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal
6. Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa, 1600 Lisboa, Portugal

Crataegus Oxyacantha, *Hamamelis Virginiana*, *Hydrastis Canadensis*, *Geranium Robertianum*, *Croton Lechleri*, *Olea Europaea* and *Allium Sativum* extracts have long been used in herbal medicine for the treatment of cardiac, circulatory and anti-inflammatory diseases.

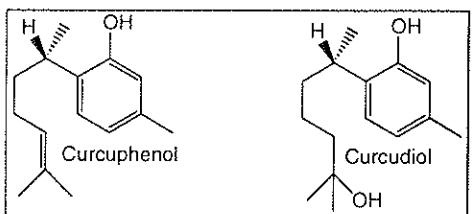
The content in phenolic compounds and the total antioxidant activity of these extracts have been measured according to literature procedures^{1,2}. The data obtained enabled to establish the following relative order of antioxidant potential: *Croton Lechleri* > *Hamamelis Virginiana* > *Geranium Robertianum* > *Crataegus Oxyacantha* > *Olea Europaea* > *Allium Sativum*.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry, GC-MS, has been applied to some of the present extracts for the chemical characterization of the antioxidant volatile compounds³.

The three methods are complementary in the evaluation of the plant antioxidant potential and may be very useful in order to assess their therapeutic use.

REFERENCES:

4. A. Cano J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Cánovas, M. Acosta and M. B. Arnao, *Phytochemical Analysis* **9**: 196-202 (1998).
5. H. M. Sharma, A. N. Hanna, E. M. Kaufmann and H. A. I. Newman *Free Rad. Biol. Med.*, **18**: 687-697 (1995).
6. A. P. Silva, R. Rocha, C. M. L. Silva, L. Mira, M. F. Duarte and H. Florêncio, *Physiotherapy Research*, **14**, 612-616 (2000).



Curcuphenol and curcidiol were already isolated from the marine sponges *Didiscus oxeata* and *Didiscus flavus*^{2,3}, while curcuphenol has been reported in the gorgonian soft coral *Pseudopterogorgia rigida* and in the terrestrial plant *Lasianthae podocephala*⁴.

- [1] N. Fusetani "Drugs from the Sea", Karger, 2000.
- [2] C. Braekman, D. Daloze, B. Moussiaux, c. Stoller and f. Deneubourg, Pure & Appl. Chem., 61(3), 509-512, 1989.
- [3] A. E. Wright, S. A. Pomponi, O. J. McConnell, S. Kohmoto and P. J. McCarthy, J. Nat. Prod., 50(5), 976-978, 1987.
- [4] J. McEnroe and W. Fenical, Tetrahedron, 34, 1661-1664, 1978.

P-14. Detecção de Contaminações Microbianas em Sumo de Laranja Natural por Micro-Extracção em Fase Sólida

Afonso Duarte; Sílvia Rocha e Ivonne Delgadillo
Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3800-193 Aveiro

O sumo de laranja natural é um dos mais apreciados e consumidos no mundo, sendo também um dos mais sensíveis e susceptíveis de sofrer modificações durante a produção e armazenamento. A análise dos componentes voláteis de sumo de laranja tem permitido identificar diferenças entre sumos com diferentes processamentos e sumos provenientes de diferentes variedades de laranjas, podendo também ser usada como um indicador da qualidade microbiológica (Fry, 1990; Shaw *et al.* 1993). Com este trabalho pretende-se estudar os compostos voláteis de sumos de laranja natural e sumos contaminados por leveduras e bactérias lácticas tendo em vista a determinação de indicadores dessa contaminação.

Neste trabalho foram utilizados sumos de laranja natural os quais foram contaminados por forma a servir como matrizes modelo que simulam as contaminações por leveduras e bactérias lácticas. Os sumos de laranja naturais utilizados foram produzidos no laboratório, tendo as laranjas sido adquiridas no comércio local. Do lote produzido foram separadas 3 porções para os diferentes ensaios: *i)* Sumo não contaminado (SN) – sumo do mesmo lote que não sofreu inoculação, servindo de controle; *ii)* Sumo contaminado por leveduras (SL) – foi adicionado ao sumo uma quantidade fixa de fermento de padeiro. Este fermento é constituído por células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* (periodos de incubação de 4 e 30 horas); *iii)* Sumos contaminados por bactérias lácticas (SB) – foi adicionado ao sumo uma quantidade fixa de iogurte natural. Neste caso pretende-se estudar o efeito do *Streptococcus thermophilus* e do *Lactobacillus bulgaricus* sobre o sumo de laranja (periodos de incubação de 4 e 30 horas). Após o período de incubação verificou-se que as amostras contaminadas apresentavam alteração de aroma.

Como técnica de extração foi utilizado a Micro-extracção em Fase Sólida (SPME) com detecção e quantificação dos compostos voláteis por GC-MS. Foi utilizada uma fibra com revestimento de poliacrilato, com uma espessura de filme de 85 µm, tendo sido previamente optimizados os parâmetros de extração e cromatográficos.

Foram identificados 52 compostos voláteis no sumo de laranja natural, 70 no

**P-12. Estimativa da Incerteza de Medição e Validação de Métodos Cromatográficos**

Helder Lopes, António Ajenjo e Douwe de Boer
Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica
Centro de Medicina Desportiva (Estádio Universitário) Av. Prof. Egas Moniz 1600-190
Lisboa

Todas as acções, variáveis e consequentemente todas as medições estão associadas a um incerteza. Para um cliente que requisita uma medição, o valor dessa incerteza tem tanta ou mais importância que o próprio valor da medição.

Nesta comunicação são apresentados os modelos e estratégias implementadas no Laboratório de Análises de Dopagem e Bioquímica para a validação, determinação de incertezas e acreditação de ensaios baseados em técnicas cromatográficas nomeadamente GC/MS, GC/MS/MS e GC/NPD. É descrito um planeamento de experiências que permite por um lado a avaliação de parâmetros tais como a especificidade, limites de detecção e quantificação, percentagens de recuperação, linearidade, gama de trabalho, precisão e exactidão e por outro, a implementação de um modelo de cálculo de incertezas de medição de acordo com o guia Eurochem (Quantifying uncertainty in analytical measurement -2000) dando desta forma provimento aos requisitos da norma internacional NP EN/CEI 17025.

São apresentados exemplos de implementação deste planeamento de experiências para a determinação quantitativa de esteroídes anabolizantes em baixas concentrações em amostras de urina humana, com a aplicação de curvas de calibração e da técnica de GC/MS/MS.

**P-13. Curcphenol and Curcidiol, Bioactive Metabolites From The Marine Sponge *Didiscus oxeata***

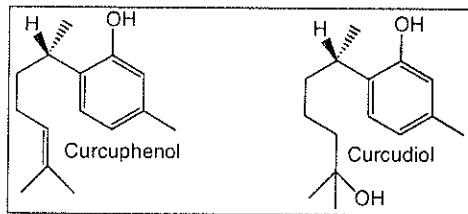
H. Gaspar*, S. Feio*, M. A. Medeiros*, S. Gaudêncio*, R. Tavares*, M. J. Marcelo Curto*, C. Devijver[§], J. C. Braekman[§], R. Gomez[#], M. de Kluijver[#] and R. Van Soest[#]

*INETI/DTIQ, Estrada do Paço do Lumiar, 1649-038, Lisboa, Portugal; [§]Faculty of Sciences, Université Libre de Bruxelles, 50 Av. F. Roosevelt, 1050 Brussels; Belgium, #Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam, P.O. Box 94766, 1090-GT, The Netherlands.

The recent emergence and clinical significance of drug-resistant bacterial infection associated with the frequency of invasive fungal infection has significantly risen with the increase of immunocompromised patients (such as those infected with HIV, receiving cancer chemotherapy or immunosuppressive therapy, and treatment with broadspectrum antibiotics) and has created an urgent need for the rapid and continued development of new classes of antibiotics that can keep pace with the changing of bacterial antibiotic susceptibility¹.

During the last three years our laboratory, in collaboration with spongologists, has been involved in the research of sponge bioactive metabolites since from marine organisms, sponges have provided the largest number of new marine natural products with biological activities. These activities are associated with the presence of specific secondary metabolites which may act to minimize predation by mobile animals and (or) to serve as weapons in spatial competition.

As part of our general interest in the isolation and characterization of new, biologically active metabolites from marine organisms, we have isolated the sesquiterpenoids curcphenol and curcidiol from the antifungal extract of the Curaçao marine sponge *Didiscus oxeata*. Optimization of GC and GC-MS conditions has allowed to detect both metabolites in the crude extract of different specimens of *Didiscus oxeata*.



Curcuphenol and curcudiol were already isolated from the marine sponges *Didiscus oxeata* and *Didiscus flavus*^{2,3}, while curcuphenol has been reported in the gorgonian soft coral *Pseudopterogorgia rigida* and in the terrestrial plant *Lasianthae podocephala*⁴.

- [1] N. Fusetani "Drugs from the Sea", Karger, 2000.
- [2] C. Braekman, D. Daloze, B. Moussiaux, c. Stoller and f. Deneubourg, Pure & Appl. Chem., 61(3), 509-512, 1989.
- [3] A. E. Wright, S. A. Pomponi, O. J. McConnell, S. Kohmoto and P. J. McCarthy, J. Nat. Prod., 50(5), 976-978, 1987.
- [4] J. McEnroe and W. Fenical, Tetrahedron, 34, 1661-1664, 1978.

P-14. Detecção de Contaminações Microbianas em Sumo de Laranja Natural por Micro-Extracção em Fase Sólida

Afonso Duarte; Sílvia Rocha e Ivonne Delgadillo
Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3800-193 Aveiro

O sumo de laranja natural é um dos mais apreciados e consumidos no mundo, sendo também um dos mais sensíveis e susceptíveis de sofrer modificações durante a produção e armazenamento. A análise dos componentes voláteis de sumo de laranja tem permitido identificar diferenças entre sumos com diferentes processamentos e sumos provenientes de diferentes variedades de laranjas, podendo também ser usada como um indicador da qualidade microbiológica (Fry, 1990; Shaw *et al.* 1993). Com este trabalho pretende-se estudar os compostos voláteis de sumos de laranja natural e sumos contaminados por leveduras e bactérias lácticas tendo em vista a determinação de indicadores dessa contaminação.

Neste trabalho foram utilizados sumos de laranja natural os quais foram contaminados por forma a servir como matrizes modelo que simulam as contaminações por leveduras e bactérias lácticas. Os sumos de laranja naturais utilizados foram produzidos no laboratório, tendo as laranjas sido adquiridas no comércio local. Do lote produzido foram separadas 3 porções para os diferentes ensaios: *i)* Sumo não contaminado (SN) – sumo do mesmo lote que não sofreu inoculação, servindo de controle; *ii)* Sumo contaminado por leveduras (SL) – foi adicionado ao sumo uma quantidade fixa de fermento de padeiro. Este fermento é constituído por células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* (periodos de incubação de 4 e 30 horas); *iii)* Sumos contaminados por bactérias lácticas (SB) – foi adicionado ao sumo uma quantidade fixa de iogurte natural. Neste caso pretende-se estudar o efeito do *Streptococcus thermophilus* e do *Lactobacillus bulgaricus* sobre o sumo de laranja (periodos de incubação de 4 e 30 horas). Após o período de incubação verificou-se que as amostras contaminadas apresentavam alteração de aroma.

Como técnica de extração foi utilizado a Micro-extracção em Fase Sólida (SPME) com detecção e quantificação dos compostos voláteis por GC-MS. Foi utilizada uma fibra com revestimento de poliacrilato, com uma espessura de filme de 85 µm, tendo sido previamente optimizados os parâmetros de extração e cromatográficos.

Foram identificados 52 compostos voláteis no sumo de laranja natural, 70 no

sumo SL e 74 no sumo SB. Como se pode verificar na figura 1, a quantidade de compostos voláteis totais no sumo de laranja aumenta com o tempo de incubação, durante a contaminação com leveduras (SL) e não sofre alterações no caso da contaminação com bactérias lácticas (SB).

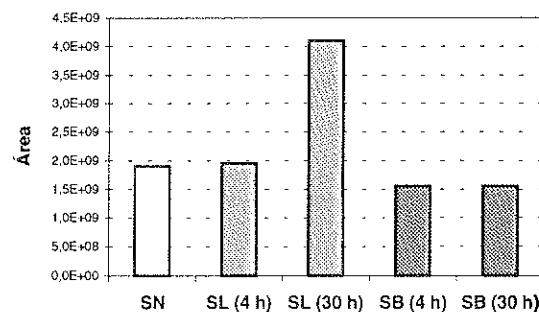


Figura 1- Fracção volátil total do sumo de laranja natural não contaminado (SN) e contaminado por leveduras (SL) e bactérias lácticas (SB).

No caso da contaminação por leveduras *Saccharomyces cereviciae* foram detectadas a partir das 30 h de contaminação quantidades superiores de 2-hexanal, etanol, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo e ácido octanóico. Destes, os compostos que se apresentaram com maiores aumentos relativamente à quantidade inicial no sumo, sobre os quais deve incidir o nosso especial interesse, foram o 2-hexanal e o etanol. Relativamente a novos compostos desenvolvidos durante a incubação, é de salientar o aparecimento do 4-vinil-2-metoxi-fenol, do 2-metil-1propanol, do 1-butanol e do dodecanoato de etilo. Relativamente à contaminação por acção de bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus bulgaricus*, foram identificadas menos diferenças significativas do que no caso anterior. Houve um aumento gradual ao longo do tempo do ácido octanóico e do terpineno-4-ol, tendo sido detectado o aparecimento do 4-vinil-2-metoxi-fenol, do acetato de nerilo e do dodecanoato de etilo em pequenas quantidades. Um composto que apresentou o mesmo comportamento tanto para a contaminação com leveduras como com bactérias lácticas foi o acetaldeído, tendo sido atingidos valores ligeiramente superiores para SL.

Estes resultados mostram que a técnica de SPME/GC-MS pode ser utilizada no controlo e detecção de contaminações microbiológicas de sumos de laranja naturais.

Assim, optimizando e calibrando o método para os nove compostos indicados anteriormente, estes podem ser utilizados como potenciais indicadores da contaminação por leveduras ou bactérias lácticas ao longo do fabrico e armazenamento dos sumos.

- Fry, J. Authentication of orange juice. In: Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages, Eds. P.R. Ashurst, Blackie Academic & Professional, Nova York, 1990.
Shaw, P. E.; Buslig, B. S.; Moshonas, M. G. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 809-813.

P-15. CG - EM no Estudo do Aroma de Aguardentes Lourinhã Envelhecidas em Madeira de Carvalho

Ilda Caldeira¹; F. Vicente², Maria Cristina Clímaco¹; A. Pedro Belchior¹, R. Bruno de Sousa³

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

inia.evn.quim@oninet.pt

2) Estagiário de fim de curso da Escola Superior Agrária de Santarém.

3) Instituto Superior de Agronomia - Departamento de Química Agrícola e Ambiental. Tapada da Ajuda, Lisboa, Portugal. Email: bruno@reitoria.utl.pt

O estudo do aroma dos produtos alimentares envolve normalmente várias etapas nomeadamente a sua descrição por grupos de provadores, a identificação e a quantificação dos seus constituintes voláteis assim como a avaliação do contributo de cada composto para o aroma final.

No caso das aguardentes vínicas *Lourinhã*, trabalhos anteriores demonstraram que a utilização de diferentes madeiras de carvalho e castanho permitia a diferenciação das aguardentes quer em termos da sua qualidade global quer em termos do seu perfil aromático [1,2]. Os trabalhos referidos permitiram ainda confirmar a importância da tecnologia de tanoaria, nomeadamente a queima das quartolas, na diferenciação do perfil aromático das aguardentes obtidas [2].

Assim este trabalho teve por objectivo avaliar qual o impacto dos factores mencionados nomeadamente madeira e queima na composição volátil de aguardentes *Lourinhã*, ao fim de um período de envelhecimento de 4 anos.

O ensaio delineado foi descrito num trabalho anterior [1]. Neste trabalho apresentamos os resultados obtidos com uma mesma aguardente *Lourinhã*, após 4 anos de envelhecimento em quartolas de 3 diferentes madeira de carvalho, carvalho português de duas zonas (CNE, CNF) e um carvalho francês Limousin (CFL), submetidas a diferentes níveis de queima (queima ligeira - QL, queima média - QM e queima forte - QF). Cada experiência foi realizada em duplicado, perfazendo um total de 18 amostras de aguardente, provenientes das 18 quartolas respectivas.

Os compostos voláteis das aguardentes foram identificados por CG-EM e quantificados num cromatógrafo (SHIMADZU GC-17A) com detector de ionização de chama e

coluna capilar (DB-Wax-30mx0.32mmx0.25μm) após extração com diclorometano [3], tendo as condições cromatográficas sido previamente optimizadas [4]. Foram identificados e quantificados 45 compostos de diferentes famílias químicas.

A análise de variância aos resultados detectou efeitos significativos dos factores em estudo, nos teores de alguns compostos. Assim verificou-se que relativamente aos fenóis voláteis as madeiras se diferenciaram pelos teores em 4-alilsiringol e que a queima teve influência nos teores de siringol e 4-alilsiringol existentes nas aguardentes, compostos que apresentaram correlações lineares positivas com os descriptores sensoriais fumo e especiarias [5].

Concluiu-se também que o aumento da intensidade da queima conduziu a acréscimos significativos nos teores de vanilina, furfural, 5-hidroximetilfurfural, 3-etilfuroato e 5-metilfurfural, compostos estes que se encontram positivamente correlacionados com os descriptores sensoriais baunilha, madeira, caramelo e queimado.

Verificou-se ainda a existência de diferenças significativas entre as aguardentes envelhecidas em diferentes madeiras no referente aos teores em 3-etilfuroato, cis-β-metil-γ-octalactona, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural.

Não se verificaram efeitos significativos dos factores em estudo, nos teores em esteres, álcoois e compostos terpénicos.

Referências bibliográficas

- [1] - Belchior A. P., Caldeira I., Tralhão G., Costa S., Lopes C., Carvalho E. (1998) *Ciência Téc. Vitiv.* 13:107.
- [2] - Caldeira I., Belchior A. P., Clímaco M. C. Bruno de Sousa, R. (2001) *Analytica Chimica Acta* (no prelo).
- [3]-Coccito C., Gaetano G., Delfini C. (1995) *Food Chemistry* 52:311.
- [4] - Pereira, R. (1998) Trabalho de fim de curso. Instituto Superior de Humanidades e Tecnologias. Lisboa.
- [5] - Caldeira I., Clímaco M. C., Belchior A. P (2000) Polyphenols Communications, Freising.

P-16. Quantificação dos Ácidos Gordos Polinsaturados no Soro e nas Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), por Cromatografia Gasosa (GC), e Determinação do α -Tocoferol, por HPLC, em Duas Populações Madeirenses

Isabel Torres¹, Cristina Ornelas e Lurdes Mira^{2,3}

¹Departamento de Química da Universidade da Madeira; ²Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; ³Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Lisboa

As doenças cardiovasculares lideram as principais causas de mortalidade e morbilidade nos países ocidentais industrializados, sendo a aterosclerose a principal causa. A par da teoria lipídica, resultados experimentais recentes, sugerem que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) constitui o primeiro evento da aterogénese. A susceptibilidade das LDL à oxidação depende, entre outros factores, do seu conteúdo em ácidos gordos polinsaturados e em antioxidantes, nomeadamente em α -tocoferol. Vários estudos epidemiológicos têm evidenciado a associação entre o elevado consumo de peixe e a baixa incidência de doenças cardiovasculares. Esta relação, tem sido atribuída ao facto do peixe ser um alimento rico em ácidos gordos ω -3 de cadeia longa, o ácido eicosapentaenoíco C20:5 (EPA) e o ácido docosahexaenoíco C22:6 (DHA). Estes ácidos parecem exercer diversos efeitos fisiológicos no homem, principalmente hipolipidémicos, anti-trombóticos e anti-aterogénicos.

Neste trabalho pretendemos investigar, a relação entre o consumo de peixe e as concentrações séricas de EPA e de DHA e a influência destes ácidos na composição dos lípidos e lipoproteínas do soro e na susceptibilidade das LDL à oxidação. Começamos por efectuar um estudo epidemiológico comparativo entre a população de uma vila piscatória (Câmara de Lobos) e a de uma vila rural (Curral das Freiras). A população da vila piscatória, que tem um elevado consumo de peixe, caracteriza-se por ter uma taxa de mortalidade por doença isquémica do coração baixa. Analisaram-se nas duas amostras as relações entre a ingestão de peixe, as concentrações em triacilgliceróis e em colesterol e o conteúdo sérico de ácidos gordos. Na 2ª parte do trabalho determinou-se o conteúdo em ácidos gordos polinsaturados e em α -tocoferol das LDL, isoladas a partir de plasmas com conteúdos em EPA e DHA significativamente diferentes, e estudámos a sua susceptibilidade à oxidação induzida pelos iões cobre.

A quantificação dos ácidos gordos no soro e nas LDL foi feita por cromatografia gasosa e a do α -tocoferol por cromatografia de elevada resolução (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) com detecção por fluorescência. O estudo epidemiológico revelou que o grupo da vila piscatória apresentava concentrações no soro de EPA e de DHA mais elevadas ($p<0,001$) e concentrações de triacilgliceróis e de colesterol total mais baixas ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Em relação ao estudo das LDL, verificaram-se diferenças no conteúdo de diversos ácidos gordos sendo as mais significativas observadas para o EPA e o DHA ($p<0,001$) com valores mais elevados na vila piscatória. Não se observaram diferenças significativas no conteúdo de α -tocoferol das LDL. No estudo de oxidabilidade das LDL verificou-se que as LDL do grupo da vila piscatória eram menos susceptíveis à oxidação. As correlações mais elevadas entre os índices de oxidabilidade e os conteúdos de ácidos gordos polinsaturados foram observadas com o EPA e o DHA. O α -tocoferol revelou não ser um factor determinante na susceptibilidade das LDL à oxidação.

Em síntese, estes estudos permitiram concluir que uma ingestão elevada de peixe está associada a um aumento da concentração no soro e nas LDL de ácidos gordos ω -3, EPA e DHA. O grupo da vila piscatória apresentou um perfil lipídico mais favorável e as LDL deste grupo, mais ricas em EPA e DHA, eram menos susceptíveis à oxidação. Os nossos resultados reforçam a hipótese de os ácidos gordos ω -3 exercerem efeitos benéficos na prevenção ou evolução das doenças cardiovasculares explicando, assim, a baixa taxa de mortalidade por doença isquémica do coração que se verifica na vila piscatória de Câmara de Lobos.

**P-17. Análise de resíduos de contaminantes em Águas de Consumo
Usando Técnicas de Injecção de Grandes Volumes.
Comparação de PTV LVI, OCLVI e SPME**

L. Anelli¹, F. Munari¹, A. Trisciani¹ e J. R. Castanho²

¹ ThermoFinnigan Italia S.p.A., Strada Rivoltana, I-20090 Rodano, Milão, Itália

² ThermoUnicam, Est. da Rocha n. 2A, Apt. 47, 2795 Linda-a-Velha, Portugal

A água é uma das substâncias mais indispensáveis à vida. A presença de resíduos de poluentes orgânicos na água, como resultado da urbanização, processos industriais e desenvolvimento agrícola, com a consequente utilização de grande quantidade e variedade de pesticidas e substâncias tóxicas, tem tido um impacto fortemente negativo no ambiente e na saúde pública.

Actualmente são exigidos aos serviços de abastecimento de água à rede pública o controlo de uma grande variedade de parâmetros químicos e bioquímicos. Destes os trihalometanos (THM) e os pesticidas organoclorados (OCP) são dos mais analisados.

A legislação corrente define para os THM e OCP um valor máximo admissível na gama dos poucos $\mu\text{g/l}$ (ppb). Os métodos cromatográficos tradicionais, que cumprem esta exigência implicam um grande dispêndio de tempo e solventes na preparação da amostra antes de ser possível a injeção de uns poucos microlitros em GC.

A determinação destes poluentes consiste essencialmente de três passos: colheita, preparação e análise da amostra. Destes passos a preparação da amostra é normalmente o mais demorado e tedioso. Além da extracção é frequentemente necessário um processo de limpeza, dado que alguns interferentes são coextractados com os analitos de interesse. Por vezes os processos de concentração, através da evaporação do solvente, provocam a perda de analitos voláteis. Nos últimos anos foram efectuados uma série de estudos (1,2,3,4,5,6) que introduziram novas técnicas de análise, o consumo de solventes e o risco de erros (nomeadamente discriminação) na preparação da amostra. São estas a 1) Injecção de grandes volumes (LVI) e a 2) microextracção em fase sólida (SPME).

As principais técnicas correntemente usadas em LVI são a a) Injecção *on-column* (OCLVI) e a b) Vaporização com temperatura programada (PTVLVI). Em ambas a extracção dos analitos é feita com uns poucos mililitros de amostra aquosa e uns poucos mililitros de solvente orgânico colocados no *vial* seguidos de um ligeiro período de agitação. 50 a 250 μl de fase orgânica são depois injectados pelo amostrador

automático, sendo depois o solvente parcial ou quase totalmente eliminado no sistema de injeção não entrando na coluna analítica (figuras 1 e 2).

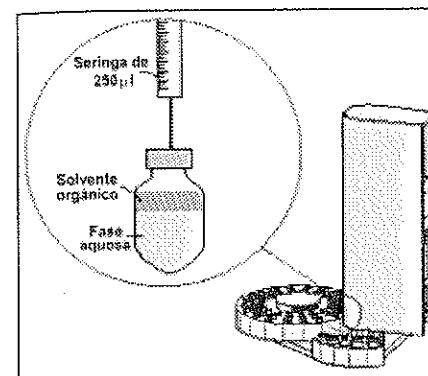


Figura 1. Extracção *in vial*.

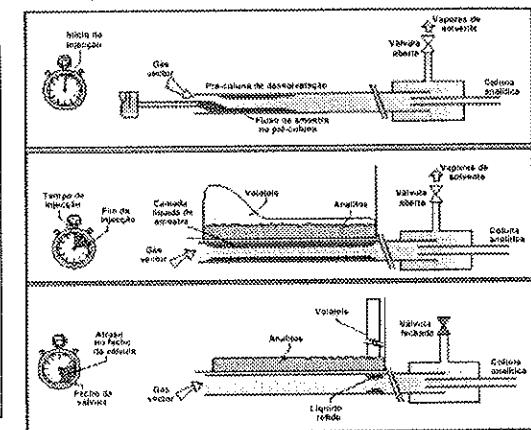


Figura 2. Passos da injeção *on-column* de grandes volumes

Foi efectuado também um estudo comparativo destas técnicas de injeção de grandes volumes com as técnicas de microextracção em fase sólida (SPME) e injeção directa de água (2) (DAI-ECD).

Referências:

- [1] F. Munari, Pier Albino Colombo, Paolo Magni, Giacinto Zilioli, Sorin Trestianu (Fisons Instruments, I-20090 Rodano, Milan, Italy)
K.Grob (Kantonales Labor, P.O.Box, CH-8030 Zurich, Switzerland) "GC Instrumentation for On-Column Injection of Large Volumes: Automated Optimization of Condition" (1995)
- [2] K.Grob, J. Chromatogr., 299(1984) 1-11
- [3] M. Termonia, B. Lacomblez, and F. Munari, J.HRC & CC, 11, 890 (1988)
- [4] J.Staniewski and J.A.Rijks, in P.Sandra (ed.) Proceedings of the 13th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, 1991, Huthig Verlag, Heidelberg (1991), 1334-1347.
- [5] K.Grob, "On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography", (Huthig, Heidelberg, Germany, 1987, 1991)
- [6] K.Grob Classical split and splitless injection in capillary GC, 3rd Edition (Huthig Buch Verlag Heidelberg 1993)

P-18. Characterization of Madeira Wines Aroma by HS-SPME-CGC-MSD

J.M.F. Nogueira^{1,2}, R. Alves¹, J.G. Barroso³, A.M.D. Nascimento⁴

¹DQB/FCUL, Campo Grande, Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

²CCMM, Campo Grande, Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa

³DBV/FCUL e CBV, Campo Grande, Ed. C2 - 2º Piso, 1749-016 Lisboa

⁴Laboratório Agrícola da Madeira, Estrada Eng. Abel Vieira, 9135 Camacha-Madeira

Madeira wines are very famous all over the world due the particular organoleptic characteristics, in which the main traditional varieties of grapes are Sercial, Verdelho, Boal and Malvasia. Madeira is commercially available in different types especially dry, medium dry, medium sweet (medium rich) and sweet (rich) in relation to the sugar content and for aging, baking conditions are implemented in order to obtained especial sensorial characteristics.

The aroma of Madeira wine depends on the varietal, fermentation and maturation compounds, which are present in highly variable amounts. The volatile fraction is mainly constituted by alcohols, esters, monoterpenes, acids and other minor components.

Solid phase microextraction (SPME) is a recent technique having a wide application with emphasis to the headspace (HS) analysis of the aroma profile of wines and other beverages.

In this work, the preliminary results on HS-SPME followed by capillary gas chromatography coupled to mass spectrometry detection (CGC-MSD) of the volatile fraction of several young Madeira wines produced from the traditional grape varieties, shown eleven constituents identified occurring in different amounts. In figure 1, it is exemplified the headspace profile of the Madeira wine sample from Sercial grape variety.

The top five components in all samples studied by increasing order of abundance are ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, ethyl decenoate and ethyl hexanoate. Nevertheless, there is a remarkable difference in the relative amounts of their main compounds as well as in the other minor components.

It is noteworthy that the content of the ethyl esters decreases with the sweetness of the samples under the same experimental conditions: Sercial (dry), Verdelho (medium dry), Boal (medium sweet) and Malvasia (sweet). It is also stressed that the aroma profile observed in the four different types of Madeira wine studied is quite similar to the ones reported for the sparkling wines.

In short, the HS-SPME-CGC-MSD showed to be an effective technique to study the aroma profile of the wines in accordance with other authors.

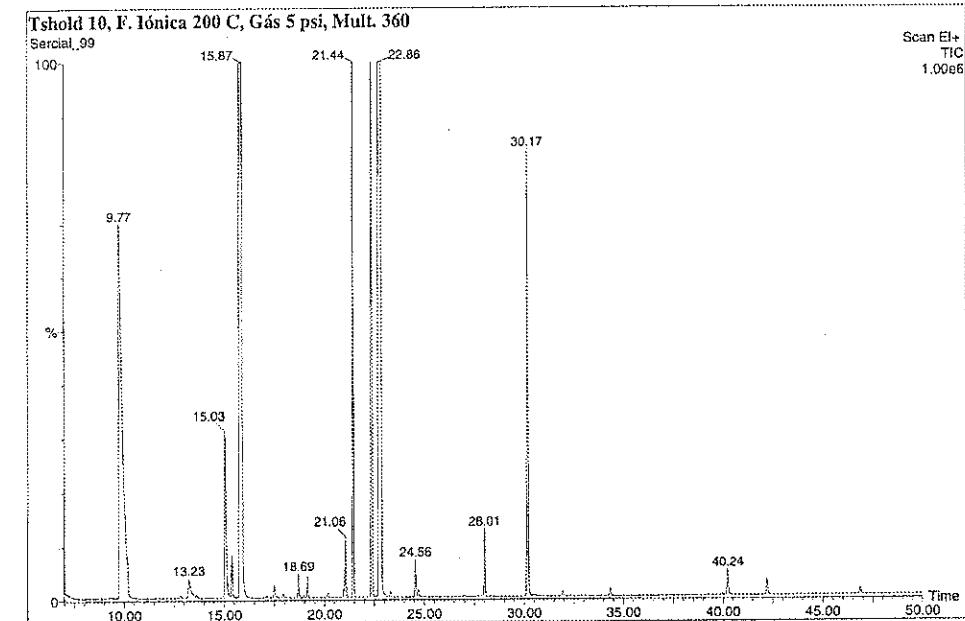


Fig. 1 – Example of the headspace profile from the Sercial sample studied by SPME-CGC-MSD analysis. 1: ethyl hexanoate; 2: phenethyl alcohol; 3: diethyl succinate; 4: ethyl octanoate; 5: vitispirane; 6: ethyl nonanoate; 7: 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl naphtalene; 8: ethyl decenoate; 9: ethyl decanoate; 10: isoamyl octanoate; 11: ethyl dodecanoate.

References

- J.M.F. Nogueira, J.G. Barroso, A.M.D. Nascimento (2001) Characterization of Madeira Wines Aroma by HS-SPME-CGC-MSD, *Proceedings of 24th*



International Symposium on Capillary Chromatography, IOPMS, Hüting, Las Vegas, USA.

- Francioli S, Guerra M, López-Tamames E, Guadayo JM, Caixach J (1999) Aroma Sparkling Wines by Headspace/Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Am J Enol Vitic*, 50 (4) 404-408.



P-19. Optimisation and Validation by SPE-CGC-MSD of the Analysis of Tributyltin in Environmental Samples

J.M.F. Nogueira^{1,2}, P. Teixeira³, M.H. Florêncio¹

¹DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

²CCMM, Campo Grande Ed. C8 - 4º Piso, 1749-016 Lisboa

³Departamento de Ecologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, 59, 7000 Évora

The optimisation by SPE-CGC-MSD methodology of the analysis of tributyltin in environmental samples is presented. Fifteen assays with certified reference material for sediment matrices (54 ± 15 ng/g), as well as with in-house standards for aqueous matrices (50 ng), were performed using solid phase extraction for tributyltin speciation, which showed to be easy, solventless and fast. The solid phase extraction tube was preconditioned with ethyl acetate to remove possible impurities, conditioned with methanol, water and HCl 5% and after tributyltin extraction, washed with HCl 5% and water and finally eluted with ethyl acetate. The samples were subsequently derivatized with methyl magnesium bromide in a diethylether solution, concentrated, injected in the splitless mode, separated by capillary gas chromatography and detected by mass spectrometry in the selected ion-monitoring mode.

The results obtained showed values of 50 ± 18 ng/g for tributyltin in the sediment matrices assays which, according to European Co-operation for Accreditation of Laboratories guidance for interlaboratory comparisons, leaded to a deviation normalised lower than 0.2. This result shows that the SPE-CGC-MSD methodology for TBT speciation in sediment samples is validated, due to the high accuracy reached. For the in-house standard aqueous matrices assays, the values of 44 ± 21 ng gave recoveries higher than 85%, showing that this methodology is also validated, due to the substantial accuracy reached for tributyltin speciation in aqueous samples.

References

- J.M.F. Nogueira, P. Teixeira, M.H. Florêncio, 2001, Optimisation and Validation by SPE-CGC-MSD of the Analysis of Tributyltin in Environmental Samples, *J. Microcolumn Sep.* 13, 48-53.

- J.M.F. Nogueira, M.H. Florêncio (2000) Optimisation by SPE-CGC-MSD of the Analysis of Organotin Compounds in Sediments, *Proceedings of 23rd International Symposium on Capillary Chromatography*, IOPMS, Riva del Garda, Italy.
- J.M.F. Nogueira, P. Teixeira, M.H. Florêncio and A.M.M. Bettencourt (2000) Analysis of Environmental Levels of Tributyltin in Sediments of the Portuguese Sado River Estuary, *Environmental Science & Pollution Research*, Abstracts, 48.

P-20. Monitorização de Desreguladores Endócrinos em Estuários Nacionais por SPE-PTV-CGC-MSD

J.M.F. Nogueira^{1,2}, P. Serôdio¹, M.H. Florêncio¹

¹DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

²CCMM, Campo Grande Ed. C8 - 4º Piso, 1749-016 Lisboa

Muita da evidência relativa à desregulação endócrina, surgiu mais concretamente na zona dos grandes lagos devido ao ressurgimento de elevados níveis de poluição, afectando espécies particulares de peixes, aves e répteis.

Em Portugal, os estuários são igualmente pressionados a todo o tipo de compostos xenoestrogénios, com particular incidência para pesticidas, ftalatos, esteróides entre outros.

Neste contexto, a cromatografia gasosa capilar apresenta-se como técnica inequívoca na monitorização da grande maioria dos desreguladores endócrinos, especialmente se acoplada à espectrometria de massa (CGC/MSD). Para análise de amostras aquosas e sedimentos, uma fase de pré-concentração por extração em fase sólida (SPE), a introdução automatizado em injector de temperatura programada (PTV) e o controlo pneumático dos gases de arrastamento (RTL), apresenta-se com vantagem ao nível da sensibilidade e reproduzibilidade analíticas.

A presente contribuição tem como objectivo o estudo preliminar da monitorização de compostos xenoestrogénios em estuários nacionais por SPE/PTV/CGC/MSD.

Referências

- Comissão das Comunidades Europeias (1999) *Estratégia Comunitária em Matéria de Desreguladores Endócrinos - Substâncias suspeitas de Interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais*, Relatório de Progresso, COM 706.

(Financiado pela FCT: PDCTM/C/MAR/15283/1999)



P-21. Volatile Composition of Banana Cultivars from Madeira Island by CGC-MSD

J.M.F. Nogueira¹, P.J. P. Fernandes² and A. M. D. Nascimento²

¹DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

²Laboratório Agrícola da Madeira, Estrada Eng. Abel Vieira, 9135 Camacha-Madeira

Banana crop was introduced during the middle of the sixteen-century, due to the favourable temperate to sub-tropical climate conditions prevailing on Madeira Island. The first cultivar introduced, "bananeira da Terra", is already extinct and at the end of the nineteen century another cultivar was introduced, the "Silver" or "bananeira de Prata", whose production is actually scarce. In 1842, *Musa acuminata* Colla variety, "Dwarf Cavendish" or "bananeira Anã", was introduced into Madeira coming from Demerara in Guyana and more recently in 1963, many farmers started to cultivate another variety of *Musa acuminata*, the "bananeira Robusta", which comes from Cape Verde archipelago.

In order to improve the quality and the production of banana fruit in Madeira Island, the official services introduced in 1992, two new cultivars of *Musa acuminata* Colla, the "Giant Cavendish" or "bananeira Grande Anã" and the "bananeira Williams" coming from Canaries Islands. Nowadays, the "Dwarf Cavendish" is the variety economically most important considering the cultivated area as well as the production volume.

The aroma profile of banana fruits from Madeira is traditionally considered very rich. Nevertheless, there isn't much information about the volatile compounds of the main cultivars - "Dwarf Cavendish", "Giant Cavendish", "Robusta" and "Williams".

In the present work, the volatile composition of banana fruit from different cultivars grown on Madeira Island is evaluated. The total volatiles shown to be complex mixtures of several classes of components, mainly, esters, alcohol's, aldehydes, ketones and acids. More than 40 compounds were identified using a Likens-Nickerson-type apparatus followed by capillary gas chromatography coupled to mass spectrometry (CGC-MSD).



The average content of the total volatiles from the "Dwarf Cavendish", "Giant Cavendish", "Robusta" and "Williams" cultivars was 93.0, 116.5, 157.3 and 157.0 mg/kg, respectively. The ester and alcoholic fractions seems to play a decisive role in the organoleptic characteristics of the banana fruit from Madeira Island, presenting a substantial content, ranging from 57.2 to 89.8 mg/kg and 19.0 to 47.7 mg/kg, respectively, in all cultivars studied, where 3-methyl butyl butanoate ester is the major constituent.

References

- Cano MP, Ancos B, Matallana MC, Câmara M, Reglero G, Tabera J. 1997. Differences among Spanish and Latin-American Banana Cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. *Food Chem* 59: 411-419.
- Macku C, Jennings WG. 1987. Production of Volatiles by Ripening Bananas. *J Agric Food Chem* 35 (5): 845-848.
- Pérez AG, Cert A, Ríos JJ, Olías JM. 1997. Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds from Two Banana Cultivars: Valery and Pequeña Enana. *J Agric Food Chem* 45 (11): 4393-4397.
- Shiota H. 1993. New Esteric Components in the Volatiles of Banana Fruit (*Musa sapientum* L.). *J Agric Food Chem* 41 (11): 2056 - 2062.

P-22. Analysis of the Volatile Fraction of Pine Trees: Comparisson Between Two different Sampling Methods and an Electronic Nose Device

M. D. R. Gomes da Silva^{1*}, Eduardo P. Mateus², Jose Munhá², M. H. Farrall², M. Rosa Paiva², Huiquinaldo J. Chaves das Neves³

¹ Centro de Química Fina e Biotecnologia CQFB ,Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, PT - 2825-114 Monte de Caparica, Portugal

²GUECKO/DCEA, Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa, PT 2825-114 Monte de Caparica, Portugal

³ Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, PT - 2825-114 Monte de Caparica, Portugal

The effects that two different sampling methods have on the analysis of the ratios of compounds present in a pine tree samples were evaluated using solid phase micro-extraction (SPME) and simultaneous distillation-extraction (SDE). The chromatographic aroma profiles from ten different pine trees are compared, and the similarities verified by principal component analysis by means of sixteen monoterpenes identified. No significant differences were observed between the methods used, even when only three enantiomeric ratios (α -pinene, β -pinene and limonene) have been studied. The discrimination among the samples, obtained through principal component analysis (PCA) is similar, although one technique uses thermal treatment (SDE) and the other not (SPME). These results are also compared with the discrimination patterns obtained through an electronic nose device (sensor array detection) after Sammon mapping. The use of different sampling methods in volatile analysis and the possible significance of this information for bio-ecological studies, namely of the interactions between conifers and phytophagous pests are here discussed for the *Pinus pinaster* variety.

P-23. Aplication of Stable Isotope Dilution Assay for Quantitative Analysis of Free Fatty Acids in Ewe Cheese

Olívia Pinho^{1,2}, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira¹, M. Beatriz P.P. Oliveira¹

¹CEQUP/ Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

R. Aníbal cunha 164; 4050-047 Porto; bromato@ff.up.pt

² Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

During ewe cheese ripening a multiplicity of volatiles is formed in low concentrations. However, the aroma compounds that are responsible for the distinct and strongly marked flavour of ewe cheese are only small fractions of this volatile mixture. In the case of ewe cheese, the major flavour contribution comes from short and medium chain free fatty acids.

This work describes a headspace SPME method in combination with GC/MS optimised and validated for the separation, identification and quantification of volatile and semi-volatile free fatty acids in ewe cheeses. The method uses a polyacrylate fiber, it is solvent-free and presents excellent sensitivity and selectivity. While the usage is simple, several factors need to be taken into consideration for reliable quantification, namely, control linear range excesses and biases due to competition effects [1]. It is also important to held constant the agitation conditions, temperature and adsorption time [2].

Figure 1 shows the comparison between peak areas versus sample amount for two cheeses containing different levels of the four major volatile free fatty acids.

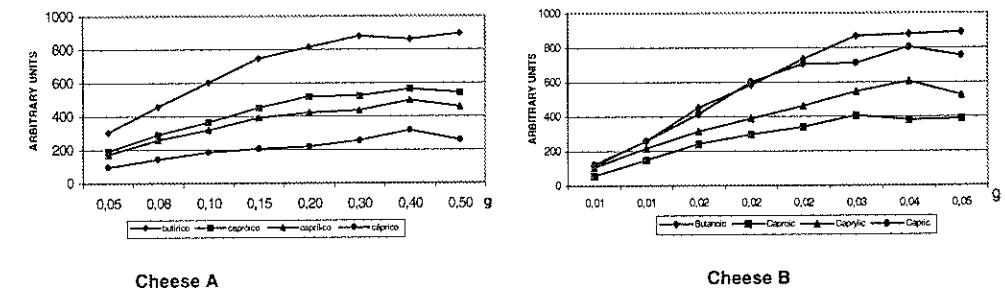


Fig.1 – Peak areas versus sample amount for two different cheeses

Cheese A contain between 0.44 and 0.972mg/100g of the major free tatty acids. In contrast, the cheese B contain between 5.8 and 16.8mg/100g of the major free tatty acids. As expected the linear range needs for this two cheeses are completely different.

The method presents good sensitivity and reproducibility as shown in Table 1.

Table 1- Detection limits and coefficient of variation (CV%) for the major free fatty acids in cheese

Fatty acids	Detection limit mg/100g	CV% (N=8)
Butanoic	< 0.7	7.9
Caproic	< 0.4	2.5
Caprylic	< 0.29	5.0
Capric	< 1.48	7.2

Standard addition method was used with success for quantification of the major free fatty acids in ewe cheese as presented in Table 2.

Table 2 - Results from quantification of major free fatty acids the ewe cheese samples

Cheese Sample	Butanoic acid (mg/100g of cheese)	Caproic acid (mg/100g of cheese)	Caprylic acid (mg/100g of cheese)	Capric acid (mg/100g of cheese)
1*	0.359	0.363	0.343	1.291
2*	0.871	0.448	0.615	0.972
3**	15.45	8.539	5.81	16.85
4**	13.26	8.41	7.04	14.73

*Quantification carried out using a sample amount of 0.2g **Quantification carried out using a sample amount of 0.03g

The results obtained by using isotope dilution assays (IDA), i.e., fatty acids labelled with stable isotopes as internal standards and using different sample amounts (even exceeding the upper limit of linear range) were in good agreement with those of Table 2.

In conclusion, quantification by headspace SPME/GC-MS is possible if biases due to competition or linear range excesses are controlled. Alternatively, this limitation can be overcome combining SPME with IDA.

- [1] Roberts D.D.; Pollien P.; Milo C. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2430-2437. [2] Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O.; Casal S., Fernandes J.O.; Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A.. *Chromatographia*, **2001**, *53*, S-390.

P-24. As Películas como Fonte Potencial de Aroma nos Vinhos Brancos da Casta Maria Gomes

Paula Coutinho; Sílvia Rocha e Manuel A. Coimbra
Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro

A casta Maria Gomes é uma das principais variedades cultivadas na Região Demarcada da Bairrada, representando 80% da produção de vinhos brancos. A melhoria das condições de competitividade dos vinhos desta casta passa pela avaliação das suas potencialidades de aroma. Em particular, o estudo das películas ganha uma maior relevância uma vez que têm sido referidas como a principal fonte de compostos terpénicos no vinho. Os compostos terpénicos têm um papel muito importante na qualidade de aroma e tipicidade de uma casta, apresentando aromas frutados e florais (1). Nas castas neutras, como a Maria Gomes, os álcoois aromáticos e norisoprenóides em C₁₃ têm um papel determinante no aroma. O conhecimento sobre a fracção potencialmente volátil da película poderá dar indicações sobre o método de vinificação que conduza à produção de vinhos de aroma mais intenso.

Os compostos potencialmente voláteis responsáveis pelo aroma encontram-se não só na forma livre, volátil e odorante, como também na forma ligada, não volátil e não odorante. Com o objectivo de conhecer estes compostos nas películas, foi estudada a fracção livre (FL) e a fracção glicosidicamente ligada (FGL). Para isso, recorreu-se a uma cromatografia em coluna com resina Amberlite XAD-2. Esta técnica consiste na adsorção dos compostos à resina, seguida da sua eluição com pentano/diclorometano 2:1 v/v (FL) e metanol (FGL). Esta metodologia tem a vantagem de isolar e separar num único passo a FV e a FGL, com recuperações de 90-100 %. A fracção FGL foi tratada seguidamente com uma β-glucosidase (Novoferm 12G). As análises quantitativas e qualitativas dos extractos de FL e FGL foram realizadas num cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrómetro de massa.

As películas da casta Maria Gomes apresentam 1,078 mg/kg e 4,528 mg/kg de compostos voláteis para a FV (19,2%) e para a FGL (80,8%), respectivamente; correspondente a 13 compostos voláteis. As películas são particularmente ricas em (Z)-2,6-dimetilocta-2,7-dieno-1,6-diol, com 2,213 mg/kg (39,5% do total dos compostos, existindo apenas na forma ligada). A importância deste monoterpenol resulta do facto de ser odorante, contrariamente à maioria dos monoterpenoídeos. O terpenol I foi

encontrado em níveis relativamente baixos nas películas, no entanto é o monoterpenol mais abundante nos mostos desta casta (2). Este facto parece indicar que este composto pode estar armazenado noutra local da uva. Em relação aos monoterpenóides, o geraniol é o mais abundante com 0,306 mg/kg (5,5% do total), o que parece indicar a existência, nas películas, de locais de biossíntese e/ou armazenamento deste composto. As películas são também ricas em álcoois aromáticos, com 1,599 e 0,557 mg/kg para o álcool benzílico (28,5% do total) e feniletílico (9,9% do total), respectivamente. Estes têm sido referidos como podendo contribuir com notas doces e florais (2). Apenas foi identificado um norisoprenóide em C₁₃, a -ionona (0,051 mg/kg). Este resultado está de acordo com estudos anteriores (3), os quais referem que as substâncias precursoras dos norisoprenóides estão localizados principalmente na fracção líquida da polpa.

Este estudo mostra que as películas da casta Maria Gomes são uma fonte potencial de compostos responsáveis pelo aroma mas estes encontram-se sobretudo na forma ligada (80,2%). A utilização de enzimas libertadoras de aroma no tratamento destes vinhos pode revelar-se importante para libertar estes compostos e conduzir à produção de vinhos de aroma mais intenso.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do PAMAF (Projecto 6039) e da Unidade de Investigação 62/94, QOPNA. P. Coutinho tem uma BD da Universidade de Aveiro.

-
- (1) Gutana, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E. *J. Chromatogr.* 1985, **331**, 83-90.
(2) Rocha, S.; Coutinho, P.; Barros, A.; Coimbra, M. A.; Delgadillo, I.; Dias Cardoso, A. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, 4802-4807.
(3) Strauss, C. R.; Wilson, B.; Anderson, R.; Williams, P. J. *Am. J. Enol. Vitic.* 1987, **38**, 23-27.

P-25. Essential Oil Composition of *Hypericum Perforatum L.* and *Hypericum Perfoliatum L.* from Portugal

Teresa Nogueira^a, Fernanda Duarte^a, Regina Tavares^a, M. João Marcelo-Curto^a,
Carlo Bicchi^b and Patrizia Rubiolo^b

^aINETI / DTIQ – Estrada do Paço do Lumiar, 1649-038 Lisboa, Portugal

^bUDST / DSTF – Via P. Giuria, 9, 10125 Torino, Italy

Following previous chemotaxonomic studies¹⁻³ of *Hypericum* L. genus (family Guttiferae) in Portugal, a study of the essential oils of different populations of *Hypericum perfoliatum* L. (two samples) and *Hypericum perforatum* L.⁴⁻⁶ (three samples) was performed. The essential oils of the plants aerial parts were obtained by hydrodistillation. The mean yield of the essential oils were 0.15% (v/w) and 0.10% (v/w) for *H. perfoliatum* and *H. perforatum* samples, respectively. GC and GC-MS analyses were carried out in order to determine the essential oils chemical composition. Thirty two components were identified. The monoterpene hydrocarbon • -pinene (51.5; 68.3%) was the main component in *H. perfoliatum*, while that of *H. perforatum* was the sesquiterpene hydrocarbon Germacrene D (19.3; 30.2; 18.8%). The remain abundant components in samples of *H. perfoliatum* were *n*-nonane (15.7; 17.3%) and *n*-undecane (9.6; 3.4%), whereas the major components in samples of *H. perforatum* were • -caryophyllene (13.0; 6.6; 9.7%), 2-methyloctane (11.1; 10.6; 13.9%) and • -pinene (9.5; 6.5; 9.1%).

¹ Nogueira, T.; F. Duarte; F. Venâncio; R. Tavares; M. Lousã; C. Bicchi and P. Rubiolo (1998). Aspectos quimiotaxonómicos do género *Hypericum* L. em Portugal, *Silva Lusitana*, **6** (1): 55-61.

² Nogueira, T.; F. Duarte; R. Tavares; M. J. Marcelo Curto; J. Capelo and A. C. Freitas (1999). Comparative study of the aromas of *Hypericum* L. species from Portugal using olfactroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 195-199.

³ Nogueira, T.; F. Duarte, Regina Tavares, M. J. Marcelo Curto, C. Bicchi, P. Rubiolo, J. Capelo and M. Lousã (1999). Quimiotaxonómica do género *Hypericum* L. em Portugal continental. V Conference on Plant Taxonomy, C 2-5, 15, Sept., Lisboa.

⁴ Gud• i• , B., S. Dordevi• , R. Pali• and G. Stojanovi• (2001). Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L.. *Flavour and Fragrance Journal*, **16**: 201-3.

- ⁵ Çakir, A.; M. E. Duru; M. Harmandar; R. Ciriminna; S. Passannanti and F. Piozzi (1997). Comparison of the volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, **12**: 285-7.
- ⁶ Weyerstahl, P.; U. Splitgerber, H. Marschall and V. K. Kaul (1995). Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India. *Flavour and Fragrance Journal*, **10**: 365-70.

Acknowledgements – We thank the FCT-Praxis XXI Program for financial support to Teresa Nogueira.

P-26. Comparação de Perfis Cromatográficos de Azeites Monovarietais e Respectivas Matérias Primas

Silva, S.¹; Gomes, M. L.^{1,2}; Coelho, C.³; Leitão, F.³; Vilas Boas, L.⁴

¹Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apt. 127, 2784-505 Oeiras

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

³Estação Agronómica Nacional, Qta do Marquês, 2784-505 Oeiras

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

Introdução

Estudos anteriormente realizados contribuiram para a caracterização fisico-química de 10 cultivares de *Olea europaea* L. (Lages *et al.*, 2001), bem como para a caracterização química dos respectivos azeites elementares (Silva *et al.*, 2001). Neste trabalho procede-se à comparação de perfis cromatográficos de componentes voláteis e de compostos fenólicos existentes nos frutos e respectivos azeites elementares, provenientes dessas cultivares.

Materiais e Métodos

O material em estudo provém de cultivares de elevado interesse económico em Trás-os-Montes: ‘Bical’ (Bic), ‘Borrenta’ (Bor), ‘Cobrançosa’ (Cob), ‘Coimbreira’ (Coim), ‘Lentisca’ (Len), ‘Madural’ (Mad), ‘Negrinha’ (Neg), ‘Redondal’ (Red), ‘Santulhana’ (San) e ‘Verdeal Transmontana’ (Ver).

Os azeites elementares foram preparados a partir de azeitonas colhidas em fase de plena maturação, usando um mini-lagar de laboratório ‘Abencor’.

Os componentes voláteis foram analisados em pastas de frutos, polpas e azeites, utilizando um cromatógrafo de fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS). A preparação das amostras foi realizada por micro extracção em fase sólida, no espaço de cabeça, a uma temperatura de 50°C, utilizando a fibra ‘Supelco, 2cm-50/30• m DVB/Carboxen/PDMS StableFlex’. Para análise de compostos fenólicos, as amostras de azeites, de pasta e polpa de azeitonas foram tratadas com solução de metanol/água, e os extractos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), num programa de 115 minutos com gradiente de solventes.

Resultados e discussão

A comparação de cromatogramas de compostos voláteis revelou grande diversidade de perfis, devido sobretudo a discrepâncias quantitativas, visto a análise dos espectros de massa indicar semelhança qualitativa para elevado número de compostos, tal como exemplificado para a ‘Redondal’ e ‘Lentisca’ na figura 1a). Os perfis das polpas pastas respectivas, mostraram analogias, como seria de prever. Os perfis dos diferentes azeites revelaram maiores semelhanças entre si que os verificados entre cada azeite e respectiva pasta do fruto de origem, o que confirma que o processamento do azeite opera marcadas mudanças a nível de componentes voláteis.

A comparação de perfis cromatográficos provenientes da análise por HPLC das polpas

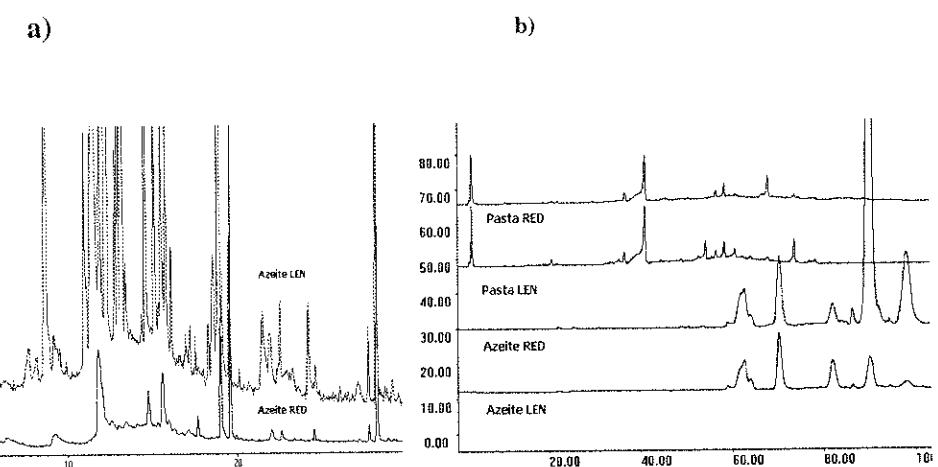


Figura 1: Perfis cromatográficos a) – Análise de azeites elementares por GC b) - Análise de azeites elementares e respectivas pastas por HPLC

pastas respectivas revelou fortes semelhanças qualitativas e algumas quantitativas para a maioria das cultivares, com exceção da ‘Santulhana’. Os perfis dos vários azeites apresentaram analogias entre si, o mesmo sucedendo em relação às pastas, figura 1b). No entanto, tal como em GC, não se notou semelhanças entre os perfis dos azeites e respectivas pastas.

Comparam-se estes perfis cromatográficos com resultados de análise sensorial.

Agradecimento

Este trabalho decorre no âmbito do projecto de investigação PIDDAC/INIA 153/00.

Referências

- Lages, M.F.; Gomes, M. L.; Leitão, F. ; Silva, S; Vilas Boas, L. "Contributo para a caracterização físico-química de frutos de dez cultivares de *Olea europaea* L." a apresentar no XV Encontro Galego Português de Química, Corunha, Novembro, 2001.
- Silva, S.; Marques D.; Gomes, M.L.; Leitão, F.; Vilas Boas, L. "Azeites elementares de cultivares de Trás-os-Montes e Alto Douro: Contribuição para a caracterização química" Actas do 5º Encontro de Química de Alimentos, 536-538, Porto, Maio, 2001.

P-27. Comparaçao de Perfis Cromatográficos de Tomates e Produtos Derivados

Cláudia Santinho¹, M.R. Bronze^{2,3}, L. Vilas Boas^{2,4}

¹Estação Agronómica Nacional, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

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

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

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

O tomateiro (*Lycopersicum esculentum* P. Miller) é uma hortícola que apresenta um elevado número de variedades que podem ser usadas para consumo em fresco ou processamento industrial, de acordo com as suas características externas (forma, tamanho, cor) e internas (sabor, textura, firmeza).

Do ponto de vista do consumidor, é muito importante assegurar a uniformidade da qualidade dos produtos processados de tomate, bem como do próprio tomate comercializado em fresco. A preferência do consumidor é influenciada principalmente pela aparência do fruto, consistência, flavor e aspectos nutricionais.

A fracção volátil do tomate é constituída por várias centenas de compostos embora só uma parte desse compostos sejam responsáveis pelo aroma dos frutos ou dos produtos derivados e contribuindo assim para a sua qualidade.

Este trabalho teve como objectivo obter e comparar perfis cromatográficos dos componentes voláteis tendo em vista facilitar a programação dos trabalhos de avaliação de qualidade por meio de análise sensorial para os produtos frescos e processados.

Materiais e Métodos

As amostras usadas neste estudo incluíam cultivares de tomate para indústria (Perfect Peel) e para consumo em fresco (tipo 'Cacho' e tipo 'Cereja'), uma marca comercial de tomate enlatado inteiro e duas de polpa de tomate em embalagem Tetrapak. As amostras de tomate Perfect Peel foram colhidas em campos experimentais localizados nas zonas de Vila Franca de Xira e de Azambuja, enquanto as de tomate para consumo em fresco foram obtidas no mercado local.

Cada amostra de tomate (cerca de 30 g) foi introduzida em frasco estanque e procedeu-se à concentração dos compostos voláteis existentes no espaço de cabeça por microextração em fase sólida (60 min à temperatura ambiente) utilizando-se uma fibra Supelco (Polidimetsiloxano/Divinilbenzeno/Carboxeno). As análises cromatográficas

foram realizadas por CG-MS (Shimadzu QP-5000) equipado com uma coluna J&W 1701P de 30 m.

Resultados e Discussão

A comparação dos perfis da cultivar Perfect Peel proveniente de 2 campos experimentais que diferiam quanto ao tipo de solo e práticas culturais aplicadas (fertilizações, regas, produtos fitofarmacêuticos) permitiu verificar diferenças apreciáveis nas concentrações de heptanal, terpinoleno, 2-pentilfurano, limoneno, 2-isobutiltiazol, trans-2-octenal e cis-6,10-dimetil-5,9-undecadieno-2-oná que eram maiores numa das amostras, enquanto na outra predominava o trans-2-hexenal, 1-nitropentano e cis-3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ol. Assim, é previsível que estes frutos apresentem características sensoriais diferentes pois aqueles compostos fazem parte do conjunto de compostos voláteis que mais contribuem para o aroma em tomate fresco.

Comparando o perfil cromatográfico duma polpa de tomate com o do tomate (Perfect Peel), verificou-se a presença de sulfureto de dimetilo, acetato de etilo, 3-metilbutanal, 1-octeno, benzeneacetaldeído, 2-furancarboxaldeído na polpa. Em contrapartida, o perfil correspondente ao tomate mostrava uma maior quantidade de hexanal, heptanal, limoneno, 2-isobutiltiazol, trans-2-octenal, e cis-6,10-dimetil-5,9-undecadieno-2-oná.

No caso dos produtos derivados de tomate, as condições de processamento com destaque para as elevadas temperaturas vão causar alterações apreciáveis na composição da fracção volátil pelo que faz sentido avaliar a contribuição relativa dos componentes presentes nas matérias primas e os formados durante o processamento para as características sensoriais e qualidade destes produtos.

Agradecimento

Este trabalho decorre no âmbito do projecto PARIPIPI B/INIA.

Referências

A. Krumbein, D. Ulrich, in "Flavour Science. Recent Developments", (Eds. A.J. Taylor, D.S. Mottram), 289-292, 1996.

COMUNICAÇÕES EM PAINEL

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA e ELECTROFORESE CAPILAR



**P-28. Determinação de Trans-2-Nonenal em Cerveja por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção
Espetrofotométrica**

João Rodrigo Santos, J. Ricardo Carneiro, Luís F. Guido, Paulo J. Almeida, José António Rodrigues,
Aquiles A. Barros

Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto
Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

A cerveja deteriora-se ao longo do tempo, devido ao desenvolvimento de diversos sabores/aromas responsáveis pela perda das suas características organolépticas normais. Um dos casos mais importantes é o aparecimento do sabor/aroma a papel/cartão que surge durante o envelhecimento da cerveja e que está associado à presença do *trans*-2-nonenal. Este aldeído possui um limite de percepção muito baixo, pelo que é facilmente detectado sensorialmente (limite de percepção de 0,03• g/L). Têm sido propostos vários mecanismos para explicar a formação do *trans*-2-nonenal na cerveja⁽¹⁾, (por exemplo, a oxidação de ácidos gordos, a condensação aldólica, *etc.*) mas subsistem muitas dúvidas quanto à preponderância de cada um deles na formação de *trans*-2-nonenal. É, no entanto, importante identificar quais são os principais mecanismos envolvidos no aparecimento de *trans*-2-nonenal na cerveja, de forma a poder-se agir sobre eles minimizando-os ou eliminando-os.

A metodologia proposta neste trabalho para a determinação do *trans*-2-nonenal na cerveja, surge como uma alternativa aos métodos existentes^(2,3), e ainda, como uma ferramenta para o estudo e caracterização dos equilíbrios em que participa o *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja.

O procedimento utilizado divide-se em três etapas:

1. Destilação de 250 mL de amostra de cerveja por arrastamento de vapor com recolha de 10-15mL de destilado.
2. Passagem do destilado recolhido numa coluna C18 com retenção do *trans*-2-nonenal seguida de reextração da fração retida na coluna com 1,00mL de acetonaítrilo (aumento total da concentração de *trans*-2-nonenal de 250 vezes).
3. Análise da solução orgânica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espetrofotométrica.

A etapa de destilação da cerveja por arrastamento de vapor é um passo crítico, uma vez que a temperatura utilizada na destilação pode induzir a formação de *trans*-2-nonenal a partir de percursos existentes na cerveja. Os estudos realizados em amostras de cerveja permitiram determinar um volume óptimo de destilado a recolher contendo todo o *trans*-2-nonenal que é possível extrair da cerveja, antes que ocorra formação apreciável deste aldeído a partir da matriz.

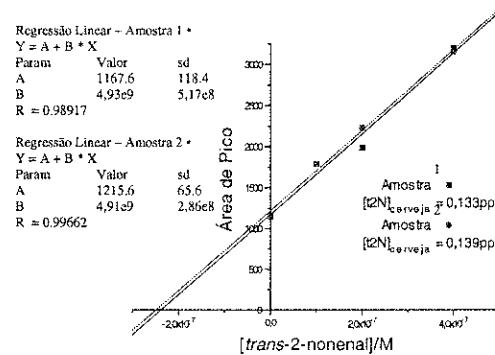


Figura 1. – Aplicação do método de adições sucessivas de padrão na determinação de *trans*-2-nonenal em cerveja

Foi igualmente estudada a influência do teor em sulfito nesta determinação. O sulfito é vulgarmente adicionado no fabrico de cervejas devido às suas propriedades de antioxidante, e ainda, devido à sua capacidade de formar aductos com aldeídos. Verificou-se que a presença de sulfito na cerveja (nas quantidades habitualmente encontradas), não influiu na determinação de *trans*-2-nonenal, pelo que, esse composto não constitui uma interferência do método.

As principais vantagens do método proposto são a simplicidade do processo de extração de *trans*-2-nonenal, o baixo custo de análise e a boa correlação linear que se obtém entre o sinal medido e a concentração de *trans*-2-nonenal (ver Figura 1.).

Bibliografia:

- 1) Walters, M. T., *Institute of Brewing*, **10**, (1997), 111-119
- 2) Noël, S., Liégeois, C., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, (1999), 4323-4326
- 3) Verhagen C., Strating, J., *J. of Chromatography*, **393**, (1987), 85-96

Agradecimentos:

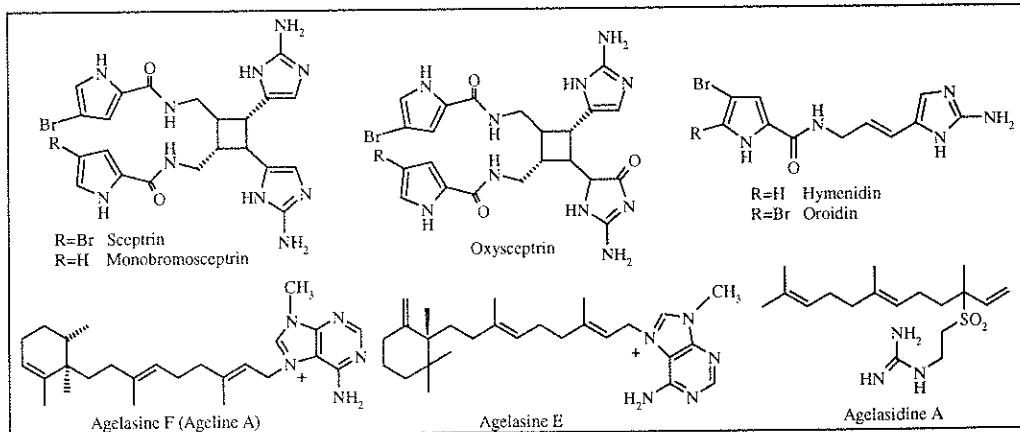
Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e a colaboração da Unicer, Bebidas de Portugal S. A.

P-29. HPLC Analysis of Alkaloids from Marine Sponges From *Agelas* spp.

*MEDEIROS, M. A., *GAUDÊNCIO, S., *GASPAR, H., *TAVARES, R., *MARCELO-CURTO, M. J., §DÉVIJVER, C., §BRAEKMAN, J. C., #GOMEZ, R., #DE KLUIJVER, M., #VAN SOEST, R. #

*INETI/DTIQ, ESTRADA DO PAÇO DO LUMIAR, 1649-038 LISBOA, PORTUGAL; §FACULTY OF SCIENCES, UNIVERSITY OF BRUSSELS, 50 AV. F. ROOSEVELT, 1050 BRUSSELS, BELGIUM; #INSTITUTE FOR BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM DYNAMICS, UNIVERSITY OF AMSTERDAM, P.O. BOX 94766, 1090-GT, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS.

Marine sponges have proved to be rich sources of metabolites with unusual structural features reported in recent years as active leads for new drug development. With the aim of contributing to the search of bioactive compounds from sponges of the genus *Agelas*, the chemical study of several species from this group collected off Spain and Curaçao was performed. On the basis of their structure, two types of *Agelas* alkaloids were isolated: pyrrole-2-carboxylic acid derivatives and terpenoid derivatives. A series of brominated pyrrole alkaloids (hymenidin, sceptrin, oroidin, oxysceptrin and monobromosceptrin) were isolated from various *Agelas* species namely: *A. dispar*, *A. clathrodes*, *A. conifera* and *A. oroides*. The isolation from *A. clathrodes* of Agelasidine A, a terpenoid derivative of hypotaurocyamine and Agelasine E and Agelasine F (AgelineA), two diterpene derivatives of quaternary 9-methyladenine, was carried out for the first time. The implementation and optimization of conditions for HPLC analytical determination of all these alkaloids was achieved.



**P-30. Isolation of phenolic compounds from *Ficus carica* leaves by column chromatography followed by solid phase extraction**

Raquel Patão, Dora Martins Teixeira, Cristina Teixeira da Costa

Universidade de Évora, Departamento de Química

Plants have always been and continue to be one of the main sources of therapeutic drugs. There are several reports on the literature where different parts of *Ficus carica* (fig tree) are used to treat an array of ailments. This plant belongs to the *Moraceae* family known to be rich in phenolic compounds, some of them with proven bioactive properties.

In order to identify new bioactive compounds we are pursuing the analysis of extracts from different parts of the *Ficus carica* tree. Dried leaves of *Ficus carica* tree were extracted with methanol:water (9:1). The aqueous extract (obtained by removing methanol) was partitioned with solvents of increasing polarity, resulting in four main extracts: hexane, chloroform, ethyl acetate and water. The chloroform extract was then subject to column chromatography with silica and a gradient of solvents from hexane: chloroform (9:1) to methanol, resulting in fourteen fractions, most of them with more than one component. Isolation of pure compounds from some of these fractions was impossible on a silica column, but was achieved by a C₁₈ SPE column. The samples were dissolved in methanol: water (1:9) and applied to the SPE column. Separation of individual components was achieved with a gradient elution using mixtures of methanol: water containing increasing amounts of methanol. The purity of individual components was checked by bi-dimensional TLC.

With this work we have shown that an inexpensive SPE column can be used in a similar way to a reversed phase LC column to separate a mixture with a small number of components.

**P-31. The use of LC-APCI-MS to Identify Prenyl Phenolic Compounds in Plant Extracts**

Cristina Teixeira da Costa*, Sam A. Margolis**, Derek Horton#

*Universidade de Évora; **National Institute of Standards and Technology (EUA); # American University (EUA)

Plant phenolics are bioactive secondary metabolites present throughout the plant kingdom, with the most important single group being the flavonoids. Plant phenolics occur in a variety of basic structural forms that can be modified by a number of processes that might include the prenylation of some hydroxyl groups. This modification has an important chemotaxonomic value: for example, the presence of prenyl or geranyl groups in the xanthone nucleus was only identified in compounds isolated from the *Gutiferae* and *Moraceae* plant families.

The osage orange tree (*Maclura pomifera*) is a member of the *Moraceae* plant family, and several prenylated phenolics including flavanones, xanthones and isoflavones, had reportedly been isolated from different plant extracts^{1,2}. Structural identification of these compounds had been done by isolation of the pure compounds followed by spectroscopic studies. These compounds revealed an array of prenylated structures which arise from further change of the prenyl group, the most characteristic of which being the oxidative cyclization with an ortho-OH group to form a chromene ring.

Extracts from the fruit of osage orange tree were now subjected to LC-APCI-MS in the positive-ion mode. With the appropriate set of conditions the [MH]⁺ ions as well as characteristic fragments for each compound were observed. In agreement with previously reported data³, the optimum voltage for fragmentation was found to be related to the class of compounds analyzed and, within each class, to be dependent on the structure of the prenyl moiety. Collision-induced pathways consistent with precedent literature describing MS characterization of similar compounds and with the observed fragmentation patterns are tentatively proposed.

- 1- M. L. Wolfrom, F. Komitsky Jr., and P. M. Mundell, *J. Org. Chem.* 30, 1088 (1965)
- 2- G. Delle Monache, F. Ferrari and M. Pomponi, *Phytochemistry* 23, 1489 (1984)
- 3- C. T. da Costa, J. J. Dalluge, M. J. Welch, B. Coxon, S. A. Margolis and D. Horton, *J. Mass Spectrom.* 35, 540, (2000)

P-32. Determinação do Ergosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Concentrado de Tomate

Salданha, C.; Alves, L.; Felgueiras, I.

DTIA - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI
Estrada do Paço do Lumiar, PT - 1649 - 038, Lisboa, Portugal,
e-mail: Ilidia.Felgueiras@mail2.ineti.pt

A detecção da presença de fungos em alimentos constitui um índice de avaliação das condições higienico-sanitárias no processamento e armazenamento de matérias primas e do produto acabado, como é o caso do tomate. O ergosterol é o esterol predominante, produzido pela maior parte dos fungos presentes nas plantas, sendo os esterois um importante constituinte das paredes celulares dos fungos. Assim houve necessidade de desenvolver um método que permitisse quantificar a sua presença em concentrado de tomate.

O método de quantificação baseia-se no proposto método de Zill et al (1988) adaptado por Schwadorf and Muller (1988) para quantificar o ergosterol em cereais. Este método consiste numa saponificação directa da amostra, seguida de filtração e extração com n-hexano.

A detecção do ergosterol foi executada por cromatografia Líquida de Alta Eficácia (HPLC), tendo-se determinado os limites de detecção e de quantificação, uma taxa de recuperação na ordem dos 100% e uma boa reprodutibilidade e repetibilidade. Este método apresenta enormes vantagens para a avaliação das matérias primas utilizadas no fabrico do concentrado de tomate, face ao método de Howard tradicionalmente utilizado.

P-33. Estudos por HPLC Quiral e Não Quiral de Kielcorinas isoméricas Obtidas por Síntese

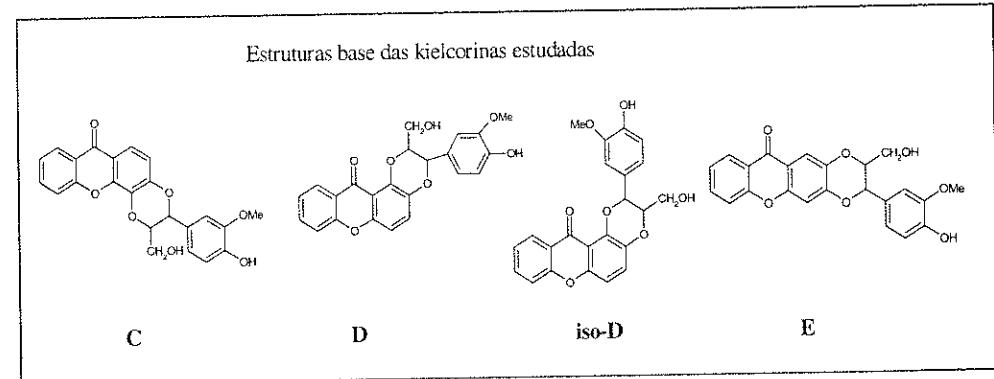
E. Sousa^{a,b}, M. E. Tiritan^{a,b}, C. M. Afonso^a, Q. B. Cass^c, M. M. Pinto^a

^aC.E.Q.O.F.F.U.P.; Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha, 164
4050-047, Porto, Portugal

^bI.S.C.S. - Norte, Rua Central da Gandra, 1317, 4580 Gandra, Portugal

^cDepartamento de Química-Universidade Federal de São Carlos-CP676-13565-905-São Carlos-SP

As kielcorinas são derivados 1,4-benzodioxânicos, pertencentes à classe dos xantonolignóides. Estes compostos revelam frequentemente actividades biológicas interessantes [1,2]. No desenvolvimento de um trabalho de pesquisa a decorrer no CEQOFFUP, englobando síntese [3,4] e determinação de actividades biológicas de xantonolignóides, foram obtidas a *trans*-(±)-kielcorina C (1), a *cis*-(±)-kielcorina C (2), a *trans*-(±)-kielcorina D (3), a *trans*-(±)-isokielcorina D (4) e a *trans*-(±)-kielcorina E (5).



Com o objectivo de melhorar a regiospecificidade e esteriosselectividade da reacção de acoplamento oxidativo envolvida na síntese destes compostos [3,4], avaliou-se a interferência dos vários agentes oxidantes na natureza e na quantidade dos isómeros kielcorínicos obtidos. Nesta comunicação é apresentado um método por cromatografia de alta resolução para quantificação das kielcorinas 1-5 nos produtos reaccionais e também, a resolução enantiomérica dos derivados kielcorínicos, utilizando fases estacionárias quirais de carbamato com derivados polissacarídeos [5] em condições de fase normal, reversa e polar-orgânica. Das fases estacionárias quirais utilizadas as que apresentaram os melhores resultados foram as de amilose, nomeadamente amilose (*S*)-metilbenzilcarbamato revestida em APS-Nucleosil (7⁺ m, 120Å). A separação



enantiomérica dos diferentes derivados é de todo o interesse dada a actividade demonstrada em estudos *in vitro* de citotoxicidade em três linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (mama), TK-10 (renal) e UACC-62 (melanoma) pelos racematos [6].

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.
- [2] A. Abou-Shoer, A. Habib, C. Chang, J. M. Cassady, *Phytochemistry*, 1989, 28, 2483.
- [3] M. M. M. Pinto, A. A. L. Mesquita, O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1987, 26, 2045.
- [4] E. R. Fernandes, M. M. Pinto, A. M. S. Silva, J. A. S. Cavaleiro e O. R. Gottlieb, *Heterocycles*, 1999, 51 (4), 821.
- [5] Cass, Q. B.; Tiritan, M. E.; Bassi, A. L.O.; Calafatti, S. A. e Degani, A. L. G. *Quimica Nova*, 1997, 20 (1), 49.
- [6] M. M. M. Pinto, M. S. J. Nascimento, M. E. S. P. Sousa, M. Pedro e F. Cerqueira "Effect of 3,4-dihydroxyxanthone and kielcorin derivatives against human cancer cell lines and human T-lymphocyte proliferation", 17th International Congress of Heterocyclic Chemistry, Viena, Áustria, 1-6 Agosto, 1999.

Agradecimentos FCT(I&D Nº 226/94), POCTI(QCAIII), FEDER e PRAXIS XXI (BD/15663/98 a Maria Emilia S. P. Sousa).



P-34. Electrodialytic Remediation of Creosote Treated Timber Waste: The Chromatographic View

Eduardo P. Mateus¹, Alexandra B. Ribeiro¹, Mercedes Tojero

¹Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, P-2825-114 Caparica, Portugal,

Alternative options, concerning the disposal of treated wood, are becoming more attractive to study. Inside this approach the electrodialytic process seems to be a promising remediation technique for removal of preservation chemicals from treated wood. The method uses the electric current and its effects in the medium as the "cleaning agents". The technique was tested using a *Pinus pinaster* Ait railway sleeper treated with creosote at the wood preservation unit from the Portuguese Railways (Entroncamento). The sleeper was grinded and 50 g of the resulting chips, saturated with distilled water, were placed inside an electrodialytic laboratory cell. The sample was submitted to the electrodialytic process during 15 days. The anolyte and catholyte solutions were collected every 24 h or 48 h and the analytes extracted by solid phase extraction (SPE) using ENVI-18 Disks. The resulting extracts were, after concentration to 1.0 ml, analysed by HPLC with a Diode Array Fluorescence Detector. This work reports the preliminary chromatographic results obtained from the application of the electrodialytic remediation process to a railway wood sleeper treated with creosote.

P-35. Estudo de Alguns Problemas Analíticos da Cromatografia Iônica

A. Rita Moreira, Liliana Quintão, M. João Nunes, M. Filomena Camões
CECUL-DQB, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Edifício C8, Campo Grande, 1749-016
– Lisboa

A crescente utilização da cromatografia iônica (IC) como método de análise para diversos tipos de amostras é devida à elevada sensibilidade e especificidade desta técnica e também à capacidade de determinação simultânea de várias espécies iônicas. Em química atmosférica, na análise da fracção solúvel em água, de amostras de aerossóis, a IC é aplicada na determinação quantitativa das espécies iônicas maioritárias.

Os aerossóis atmosféricos podem ser provenientes de atmosferas marinhas, urbanas, rurais ou outras. A sua existência pode então ocorrer numa vasta gama de concentrações atmosféricas. Este facto implica que as técnicas experimentais utilizadas para a sua avaliação sejam realizadas sob diferentes condições analíticas.

O cromatógrafo iônico Dionex DX-500 está equipado com uma bomba isocrática (IP20) e um detector de condutividade (CD20). No decorrer da análise de catiões usou-se uma pré-coluna (CG12) e uma coluna (CS12) específicas para a análise de catiões e um supressor para regeneração de catiões (CSRS-I 4mm). As condições de análise foram: o eluente foi o ácido metasulfônico a 20 mmol dm⁻³, a um caudal de 1,0 cm³ min⁻¹, supressão electroquímica com uma corrente aplicada de 100 mA e tempo de injeção de 12 min.

Durante a análise de anões usou-se uma pré-coluna (AS 14) e uma coluna (AS 14) específicas para análise de anões e um supressor para regeneração de anões (ASRS-I 4 mm). As condições cromatográficas foram: o eluente foi um tampão de carbonato, 2,7 mmol dm⁻³ Na₂CO₃/0,3 mmol dm⁻³ NaHCO₃, a um caudal de 1,5 cm³ min⁻¹, supressão electroquímica com uma corrente aplicada de 50 mA e tempo de injeção de 15 min.

Considerando a resposta linear existente entre a concentração e a área foram determinadas as diferentes gamas de concentração analíticas a serem utilizadas para amostras de aerossóis de atmosferas marinhas e urbanas, em amostragens de elevado e baixo caudal de ar.

A determinação dos limites de detecção (LDD) é particularmente importante, na medida em que permite ajustar as condições operativas do sistema de IC, nomeadamente em termos de volume de injeção, consoante o tipo de amostras que se está a analisar.

Determinaram-se os LDD para os catiões Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ e para os anões CH₃COO⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ e C₂O₄²⁻. No caso das espécies catiônicas utilizaram-se volumes de injeção de 25 e de 100 µl, enquanto que, para as espécies anionicas os volumes de injeção foram de 100 e 300 µl. Estes são os volumes de injeção normalmente utilizados na análise de aerossóis provenientes de atmosferas marinhas e urbanas, respectivamente.

Os LDD foram calculados utilizando diferentes ferramentas estatísticas, tendo como objectivo a obtenção da metodologia mais adequada ao problema analítico em estudo.

Na prática, verifica-se que a determinação é limitada pelos filtros brancos, nos quais as amostras são recolhidas. Deste modo foi também determinado o limite de quantificação para as espécies Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, NO₃⁻ e SO₄²⁻.

Variações de condutividade da ordem de ± 0,4 µS ocorrem de dia para dia, associadas principalmente à preparação de eluente e às flutuações térmicas (± 2 °C), o que impõe a realização de calibrações diárias, tal como será discutido neste trabalho.

Referências

- Valcárcel, M. (1999). Principios de Química Analítica, Springer-Verlag Ibérica S.A., Barcelona.
Miller, J.C. e Miller, J.N. (1993). Statistics for Analytical Chemistry. 3rd edition, Ellis Horwood PTR Prentice Hall, London.

Agradecimentos

A. R. Moreira e L. Quintão agradecem à Fundação da Ciência e Tecnologia, pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

P-36. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução Com Derivatização Pós-coluna para Determinação dos Teores de Monensina, Narasina e Salinomicina em Alimentos para Animais: Estudo Interlaboratorial ISO

Novo, R., Felgueiras, I.

DTIA - Departamento de Tecnologia das Industrias Alimentares, INETI-LIA

Estrada do Paço de Lumiar, 1649-038, Lisboa, Portugal
e-mail: Ildia.Felgueiras@mail2.inet.pt

A monensina, a narasina e a salinomicina são ionóforos incorporados nos alimentos compostos destinados a aves, como coccidiostáticos contra várias estirpes de *Eimeria*. A monensina pode também ser utilizada como promotor de crescimento em bovinos. Sabe-se também, que estas substâncias são extremamente tóxicas para equinos. Deste modo, é de extrema importância a existência de um método que detecte e quantifique estas três substâncias, de forma precisa e reproductível.

Está em curso um estudo interlaboratorial para desenvolvimento de um método para determinação dos teores de monensina, narasina e salinomicina, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com derivatização pós-coluna. Este ensaio, no qual o nosso laboratório colabora, realizado no âmbito do grupo ISO/TC 34/SC 10, tem por base o método descrito no documento ISO/DIS 14 183.

Este novo método por HPLC, traz a vantagem de poder detectar e quantificar os três ionóforos a um dado comprimento de onda, sem que haja interferências entre eles, ou mesmo interferência de outros ionóforos tais como o lasalocid, a maduramicina e a semduramicina, tal como acontecia nos métodos espectrométricos, anteriormente usados (nomeadamente o projecto de Norma Portuguesa 4160). Este facto deve-se à derivatização pós-coluna com vanilina, que permite uma separação cromatográfica das três substâncias com boa resolução.

P-37. Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução para Determinação de Tilosina em Pré-Misturas Medicamentosas e Alimentos Compostos para Animais

Simões N., Felgueiras, I.

DTIA - Departamento de Tecnologia das Industrias Alimentares, INETI-LIA

Estrada do Paço de Lumiar, 1649-038, Lisboa, Portugal
e-mail: Ildia.Felgueiras@mail2.inet.pt

A Tilosina é uma mistura de antibióticos macrólidos produzidos por uma estirpe de *Streptomyces fradie*. Esta mistura tem como composto maioritário a Tilosina A, podendo existir numa concentração muito inferior a Tilosina B (desmicosina), C (macrocina) e D (relomicina), contribuindo para a actividade antibacteriana da mistura, a qual não deve ser inferior a 900 UI/mg de substância seca.

A Tilosina é um dos antibióticos actualmente autorizados para a suplementação de alimentos para animais, tendo como teor mínimo permitido 1 mg/Kg. O seu doseamento é, em geral, efectuado por métodos microbiológicos, bastante morosos em comparação com um método químico. Para além disso, são sujeitos frequentemente a várias interferências por parte de outros compostos.

O método apresentado envolve um procedimento de extração rápido, baseado na Farmacopeia Portuguesa. A determinação é feita usando cromatografia de alta eficácia em fase reversa, com termostatização da coluna cromatográfica a 35°C e detecção por UV, a 290 nm.

Este método permite obter percentagens de recuperação da ordem dos 90-100%, consoante a matriz em questão, e tem demonstrado ser eficaz na determinação do teor em Tilosina em pré-misturas medicamentosas e em alimentos para animais.



P-38. Determinação do Ergosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia em Concentrado de Tomate

Saldanha, C.; Alves, L.; Felgueiras, I.
DTIA - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI
Estrada do Paço do Lumiar, PT - 1649 – 038, Lisboa, Portugal,
e-mail: illidia.Felgueiras@mail2.inet.pt

A detecção da presença de fungos em alimentos constitui um índice de avaliação das condições higienico-sanitárias no processamento e armazenamento de matérias primas e do produto acabado, como é o caso do tomate. O ergosterol é o esterol predominante, produzido pela maior parte dos fungos presentes nas plantas, sendo os esteróis um importante constituinte das paredes celulares dos fungos. Assim houve necessidade de desenvolver um método que permitisse quantificar a sua presença em concentrado de tomate.

O método de quantificação baseia-se no proposto método de Zill et al (1988) adaptado por Schwadorf and Muller (1988) para quantificar o ergosterol em cereais. Este método consiste numa saponificação directa da amostra, seguida de filtração e extração com n-hexano.

A detecção do ergosterol foi executada por cromatografia Líquida de Alta Eficácia (HPLC), tendo-se determinado os limites de detecção e de quantificação, uma taxa de recuperação na ordem dos 100% e uma boa reprodutibilidade e repetibilidade. Este método apresenta enormes vantagens para a avaliação das matérias primas utilizadas no fabrico do concentrado de tomate, face ao método de Howard tradicionalmente utilizado.



P-39. Caracterização Composicional dos Constituintes de Plantas Micropagadas de *Dittrichia viscosa* por HPLC e CGC/MSD

J.M.F. Nogueira¹, M. Costa², G. Miguel e² A. Romano²

¹DQB/FCUL e CCMM, Campo Grande, Ed. C8 3º Piso, 1749-016 Lisboa

²FERN, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8000-117 Faro

Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter, vulgarmente conhecida por tágueda ou távora, é uma planta perene da família das Compositae usada no tratamento de feridas e de doenças gastroduodenais, bem como na produção de insecticidas e óleos essenciais. Desta planta têm sido extraídos diferentes compostos com interesse farmacológico, como ésteres, sesquiterpenóides, terpenóides, álcoois e flavonóides, entre outros. De acordo com trabalhos recentes, a fração de flavonóides do extracto de flores de *D. viscosa* tem uma acção gastroprotectora. O método geralmente utilizado para obtenção de compostos naturais consiste na extração a partir das plantas espontâneas ou cultivadas. A utilização de rebentos e plantas micropagadas e a cultura *in vitro* de células vegetais têm surgido como atraentes alternativas aos métodos tradicionais de obtenção de produtos naturais de origem vegetal.

No presente trabalho são apresentados resultados relativos à caracterização e comparação composicional dos constituintes da *D. viscosa* a partir de plantas espontâneas e cultivadas. Os métodos analíticos implementados foram extrações por refluxo para isolamento do extracto flavonólico e extração por hidrodestilação para isolamento dos óleos essenciais. A identificação dos flavonóides foi efectuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e dos óleos essenciais por cromatografia gasosa capilar acoplada à espectrometria de massa (CGC-MSD) das frações obtidas a partir de três tipos de material vegetal: i) culturas a crescer *in vitro*; ii) plantas micropagadas e iii) planta-mãe a crescer no campo.

P-40. Estudo da Composição em Aminoácidos Livres do Queijo de Azeitão por RPLC-DAD

J.M.F. Nogueira^{1,2}, L. Soares¹, M.H. Florêncio¹, A.P.L. Martins³, M.M. Vasconcelos³

¹DQB/FCUL, Campo Grande Ed. C8 - 3º Piso, 1749-016 Lisboa; nogueira@fc.ul.pt

²CCMM, Campo Grande Ed. C8 - 4º Piso, 1749-016 Lisboa

³DIPA/EAN-INIA, Laboratório Ferreira Lapa, ISA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

A proteólise é o processo bioquímico mais importante que ocorre durante o fabrico e maturação do queijo, no qual as caseínas são degradadas por meio de enzimas apropriadas dando origem entre outros constituintes aos aminoácidos livres, aminas biogénicas e pequenos péptidos. Neste contexto, considera-se que a composição em aminoácidos livres pode ser um importante indicador da qualidade/genuinidade do queijo de Azeitão. Este é um dos queijos portugueses com D.O.P. (Denominação de Origem Protegida), obtido a partir de leite de ovelha, que se caracteriza principalmente pela pasta amanteigada uniforme e pelo sabor e aroma característicos.

Na literatura, diversos métodos são propostos para doseamento da composição em aminoácidos livres em queijo, sendo na grande maioria constituídos por uma etapa prévia de extração por precipitação ácida, seguida de centrifugação. Posteriormente, as fases aquosas resultantes são analisadas com recurso à cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) e detecção por absorção no ultravioleta/visível, sendo antecedidas de derivatização com compostos adequados, donde se destaca o fenilisotiocianato (PITC) que origina aductos que absorvem a 254 nm.

A presente contribuição tem por objectivo, o estudo e a caracterização da composição em aminoácidos livres de diversas amostras de queijo de Azeitão, com recurso à cromatografia líquida de fase reversa e detecção por rede de dióxidos (RPLC-DAD).

Referências

- Cohen S. A., Strydom D. J. (1988) Amino Acid Analysis Utilising Phenylisothiocyanate Derivatives, *Anal. Biochem.* 174: 1-16.
- Freitas A. C., Fresno J. M., Prieto B., Franco I., Malcata F. X., Carballo J. (1998) Influence of Milk Source and Ripening Time on Free Amino Acid Profile of *Picante* Cheese, *Food Control* 9: 187-194.

P-41. Análise de Níveis de Resveratrol em Amostras de Vinho da Madeira por SPE/CE/DAD

J.M.F. Nogueira¹, M. Melo², A. M. D. Nascimento³

¹DQB/FCUL e CCMM, Campo Grande Ed. C8 - 3 Piso, 1749-016 Lisboa;

nogueira@fc.ul.pt

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Santarém, Apartado 310, 2001 - 904 Santarém

³Laboratório Agrícola da Madeira, Estrada Eng. Abel Vieira, 9135 Camacha-Madeira

O resveratrol (3,4,5-N-trihidroxistilbeno) e derivados são compostos fenólicos naturais encontrados em muitas plantas, no qual a uva e consequentemente o vinho tinto produzido são provavelmente os produtos alimentares que evidenciam teores substanciais. É considerado um potencial anti-oxidante responsável pela diminuição das doenças cardiovasculares observadas em populações habituadas ao consumo moderado de vinho. Evidencia igualmente propriedades anticancerígenicas e ao nível das doenças do sistema nervoso.

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para dosear o resveratrol em amostras de vinho, baseados principalmente na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando como detectores a absorção no UV-vis com rede de dióxidos (DAD), electroquímicos e/ou fluorimétricos. Como preparação prévia das amostras diversos métodos têm sido propostos, com particular incidência para a extração em fase sólida (SPE).

A electroforese capilar (CE) tem-se igualmente apresentado como alternativa para análise do resveratrol em vinhos e diversos tipos de antioxidantes em amostras alimentares, por ser uma técnica vantajosa, necessitar de pequenas quantidades de amostra, possuir elevada eficiência e rapidez de separação.

O presente trabalho tem como objectivo o estudo preliminar de níveis de resveratrol em amostras de vinho da Madeira por SPE/CE/DAD.

Referências

- Gu X., Chu Q., O'Dwyer M., Zeece M. (2000) Analysis of Resveratrol in Wine by Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 881: 471-481.

P-42. Determinação do Teor de Aminoácidos por cromatografia de Troca Iônica em Concentrado de Tomate

Pires, M. J.; Mimoso, M. J.

DTLA - Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI
Estrada do Paço do Lumiar, PT - 1649 – 038, Lisboa, Portugal,
e-mail: João.Borges@mail2.ineti.pt

O objectivo deste estudo consiste na adaptação do método existente para a determinação de aminoácidos em alimentos para animais, descrito na DIRECTIVA 98/64/CE DA COMISSÃO de 3 de Setembro, Anexo Parte A, à determinação de aminoácidos livres em concentrado de tomate.

Este método baseia-se na extracção dos aminoácidos livres, após precipitação e remoção por filtração, das proteínas. Os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iônica e determinados fotometricamente, após reacção com ninidrina.

Foram calculados limites de detecção, de quantificação e a repetibilidade do método.

P-43. Validação dos Métodos de Doseamento das Vitaminas B1, B2, B6 em Pescado

Oliveira, L.; Dias, M.G.; Romba, H.;

Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – Laboratório de Bromatologia e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

Introdução

A validação dos métodos de ensaio utilizados na produção de resultados analíticos é essencial à qualidade destes mesmos resultados e ao seu reconhecimento por parte dos pares. O processo de validação visa evidenciar e permite avaliar as características de desempenho do método de ensaio.

Apresentam-se as características das curvas de referência, os limites de detecção e de quantificação (analíticos e na amostra), a precisão e a exactidão dos métodos utilizados na determinação do teor das vitaminas B1 (J.O.R.F.* , 4/2/99, anexo I) , B2 (J.O.R.F.* , 4/2/99, anexo II) e B6 (J.O.R.F.*4/2/99, anexo III) em pescado.

Material e métodos

Curvas de referência

As curvas de referência são avaliadas através de representação gráfica da curva de regressão com os correspondentes pontos experimentais e do coeficiente de correlação, para verificação da qualidade do ajuste. O coeficiente de correlação é expresso como o valor médio dos coeficientes de correlação de 12-14 curvas de referência realizadas em dias diferentes com o respectivo desvio padrão.

Limites de Detecção (L.D.)

O limite de detecção analítico é o limite superior do intervalo de confiança a 95% do valor médio dos limites de detecção obtidos a partir de 12-14 curvas de referência realizadas em dias diferentes, determinados da seguinte forma: $L.D. = 3,3 \times S_{y/x}/b$, em que: $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de referência e b é o declive da mesma.

O limite de detecção na amostra é calculado a partir do limite de detecção analítico e tendo em conta a toma máxima de amostra para análise.

Limites de Quantificação (L.Q.)

Os limites de quantificação são determinados da mesma forma que os L.D. apenas substituindo o factor 3,3 por 10.

Precisão

A precisão é expressa em repetibilidade (r) e é determinada com base na norma ISO 5725(1986), analisando-se 5-6 réplicas de uma amostra homogénea por dia, em 3 dias diferentes.

Exactidão

A exactidão é avaliada através da participação nos programas internacionais de ensaios interlaboratoriais de aptidão, BIPEA - Bureau Interprofessionel d'Études Analitiques – Produits Dietétiques et de Régime – França e FAPAS – Food Analysis Performance Assesment Scheme – Reino Unido.

A exactidão é expressa em z-score ($z = (X_{lab} - X_v)/s$), em que X_{lab} é o valor obtido experimentalmente pelo Laboratório, X_v é o valor aceite como verdadeiro e s o desvio considerado pela entidade organizadora.

*Journal Officiel de la République Française

Resultados

Apresentam-se as características dos métodos de ensaio em termos de coeficientes de correlação, limite de detecção analítico em $\mu\text{g}/\text{ml}$, limite de quantificação analítico em $\mu\text{g}/\text{ml}$, limite de detecção na amostra em $\text{mg}/100\text{g}$, limite de quantificação na amostra em $\text{mg}/100\text{g}$ e repetibilidade.

Apresentam-se ainda os resultados da participação do laboratório nos ensaios interlaboratoriais de aptidão Bipea e Fapas.

Bibliografia

Miller, J.C. and Miller, J.N. (1993) *Statistics for Analytical Chemistry*, Great Britain, Ellis Horwood Limited

ISO 5725 (1986) "Accuracy (Trueness and Precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions"

ISO 8466-1 (1990). "Water quality – calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance. Part 1: Statistical evaluation of linear calibration function"

P-44. A Cromatografia Iônica na Análise de Catiões em Plantas

Madruga, M. J., Faria, I.

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

madruga@itn.pt

A exploração e tratamento do minério de urânio deu origem a milhares de toneladas de resíduos sólidos, acumulados há vários anos em escombreiras, na zona da Urgeiriça (Viseu). Estes resíduos sólidos são compostos principalmente por areias e lamas, ricos em metais e radionuclídos que podem ser mobilizados e transferidos através da cadeia alimentar até ao Homem. Para minimizar a dispersão destes resíduos pela acção erosiva de águas, das chuvas e ventos, foram plantadas nessas escombreiras pinheiros (*Pinus pinea*) e eucaliptos (*Eucalyptus globulus*), aparecendo também alguns arbustos de geração espontânea, tais como giestas (*Cytisus s. p.*).

O objectivo deste estudo é determinar as concentrações em sódio, potássio, magnésio e cálcio nessas plantas, com a finalidade de estabelecer uma relação entre a concentração catiónica e a transferência do ^{226}Ra dos resíduos para as plantas, em particular com o cálcio, cujo comportamento químico é análogo ao do rádio.

Recolheram-se amostras de plantas (pinheiros, eucaliptos e giestas) e resíduos sólidos nas escombreiras, para estudar a transferência do ^{226}Ra dos resíduos para as plantas. Determinou-se a concentração catiónica nas plantas (parte aérea), após a digestão ácida a quente com água régia, por cromatografia iônica (IC), utilizando um cromatógrafo Dionex DX 500 IC.

Os valores médios das concentrações obtidas para o pinheiro são: $\text{Na}^+ 566 \pm 82$, $\text{K}^+ 5153 \pm 223$, $\text{Mg}^{2+} 1088 \pm 50$ e $\text{Ca}^{2+} 3760 \pm 226$ sendo todos os valores expressos em mg/kg peso seco. Para o eucalipto os valores das concentrações catiónicas são, em geral, superiores aos observados para o pinheiro, sendo essa diferença mais acentuada para o cálcio que apresenta um valor cerca de três vezes superior. No caso da giesta os valores de sódio são inferiores aos verificados para as outras plantas em estudo, sendo os resultados dos restantes catiões semelhantes aos obtidos para o pinheiro. Nos pinheiros e nas giestas os valores apresentam-se segundo a seguinte ordem, $\text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+$, enquanto que para o eucalipto há uma inversão entre o K^+ e o Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+$).

Os resultados obtidos encontram-se na gama de valores referidos na literatura para vários tipos de plantas, o que indica a boa aplicabilidade desta técnica na análise deste tipo de amostras. Além disso, parece ser uma técnica rápida e fiável para a determinação de catiões em solução.

P-45. DETERMINATION OF THE HARD SEGMENT CHAIN LENGTH DISTRIBUTION IN A SEGMENTED POLYESTER-POLYURETHANE: ANALYTICAL PROCEDURE.

M.F. Barreiro^{1,2} and M.R.N. Costa²

1. Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Ap. 1134, 5301-857 Bragança, Portugal

2. Laboratório de Processos de Separação e Reacção, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

Segmented polyurethanes are block copolymers of hard and soft segments with a microphase-separated morphology. They are prepared starting from three components: an isocyanate, a polyol (polyester or polyether type) and a chain extender (usually a short chain diol or diamine). Hard segments give rise to distinct hard domains, which act as physical crosslinks, whereas the soft segments provide chain flexibility. The extremely complex problem of describing the process of coupling chemical reaction and microphase separation is far from complete solution in spite of some attempts. A weak point about modeling studies of polyurethane formation is the absence of information about the underlying chemical structure of polymers. Current physical characterization methods show the consequences of microphase separation but do not actually measure segment length distributions.

An analytical procedure to experimentally measure the hard segment chain length distribution (HSCLD) of polyester-polyurethanes was developed by our group. We have shown that acid hydrolysis of a polyester-polyurethane sample selectively destroy the ester groups yielding a mixture of oligomers containing the intact hard segments. The resulting mixture of oligomers can be analyzed by size exclusion chromatography (SEC) providing a way of measuring the real HSCLD (Barreiro et al., 1994).

In this work, a polyurethane system based on a polycaprolactone diol (PCL2000), 4,4'-methylene-diphenylene diisocyanate (MDI) and 1,4-butanediol (BD) as chain extender was used. Samples of 100 to 150 mg were dissolved in a 0.25 M HCl solution in dimethyl sulfoxide with 8.2% water and placed in a thermostatic bath at 80 °C during 36 hours. The final solution was neutralized with sodium hydrogen carbonate. The samples for the SEC trials were obtained by dilution with DMF of the resulting hydrolysis solution. The apparatus was a Gilson equipped with a UV detector working with UV absorption at 280 nm. A set of two columns was used: PLgel 5μ 500A + PLgel 5μ 100A. The mobile phase was DMF (60 °C) at a flow rate of 0.5 ml/min. Homemade

software (DECCRO) was used to fit by least squares the observed chromatographic trace by a sum of Gaussian peaks, with variable heights and widths as needed.

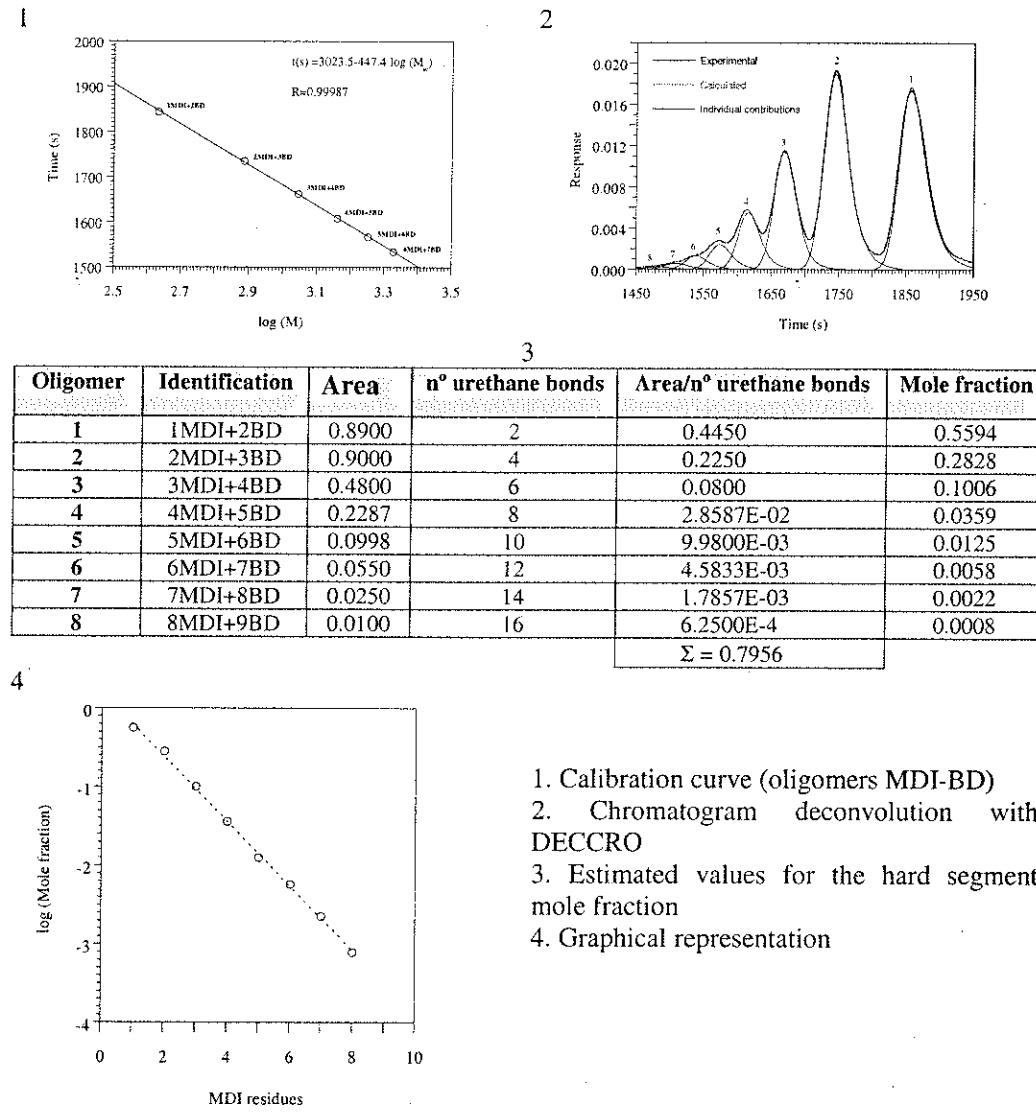


Figure 1. Experimental determination of the HSCLD.

This analytical procedure, albeit specific to polyester-polyurethanes, is a step ahead on the determination of the real HSCLD. More pronounced effects of the hard segment content or polymerization method on the HSCLD were observed than would be expected based on the theoretical models for homogeneous conditions.

References: Barreiro, M.F., Dias, R.C.S., Costa, M.R.N., *Macromolecules* **27**, 7650 (1994)

P-46. Detecção de Fungicidas na Película de Uvas por SPE/HPLC DAD

Maria Joana Teixeira, Arminda Alves e Margarida M. S. M. Bastos¹

¹LEPAE-Dep. de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal, mbastos@fe.up.pt

Introdução

O uso disseminado de pesticidas na agricultura pelas nações industrializadas resultou em problemas muito graves para a Humanidade nomeadamente a contaminação dos recursos naturais (alimentos, águas, solos, etc.). Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver métodos para detectar/quantificar os resíduos fitossanitários usados na cultura da videira. Esses trabalhos maioritariamente aplicam-se a vinhos, mostos e uvas no seu todo [1-3].

O objectivo deste trabalho consiste em desenvolver uma metodologia que permita avaliar o teor de determinados fungicidas usados em Protecção Integrada: cimoxanil, oxadixil, ofurace, metalaxil, azoxistrobina, folpete, vinclozolina, flusilazol, nas películas ao longo da fase de desenvolvimento e maturação das uvas.

Metodologia:

A metodologia experimental engloba uma extracção preliminar sólido-líquido, uma etapa posterior de *clean-up* e concentração por SPE (*solid phase extraction*) e a análise cromatográfica por HPLC com detecção por matriz de díodos-DAD.

Os resíduos de pesticidas presentes em 100 g de bagos foram extraídos com metanol (100 ml). Após filtração do extracto metanólico por lâ de vidro, cada amostra foi concentrada no rotavapor até se obter um volume mínimo de solução. O analito foi retomado numa solução aquosa de metanol:água.

Posteriormente utilizaram-se as minicolunas Supelclean - LC-8 para purificação e concentração do extracto. A eluição dos fungicidas retidos na coluna foi efectuada com diclorometano, sendo evaporado à secura e retomada em metanol:água (55:45, v/v). Nas condições descritas, a amostra é concentrada cerca de 200 vezes.

O doseamento dos analitos foi realizado por HPLC através de uma coluna Macherey-Nagel Superspher RP-18 *endcapped*, à temperatura ambiente. A fase móvel era constituída por metanol:água com uma composição inicial de 55:45 (v/v), variando até

aos 100% de metanol ao fim de 25 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 0,7 ml/min e o volume de injeção de 100 µl. A detecção foi efectuada por um detector de matriz de díodos, tendo-se feito um estudo prévio para encontrar o comprimento de onda mais adequado para a realização das análises aos vários pesticidas – 207 nm.

Resultados e discussão:

Numa primeira fase foi optimizado todo o procedimento experimental que conduziu às condições operatórias acima descritas. As principais características de validação do método implementado são as seguintes:

- o tempo total de análise cromatográfica é 25 minutos;
- a gama de lineariedade da resposta cromatográfica é aproximadamente 2 a 20mg/L para cimoxanil, oxadixil, ofurace e folpete e 0,5 a 5mg/L para os restantes;
- o limite de detecção na amostra (atendendo a que os analitos são concentrados 200 vezes) é aproximadamente e em média de 6 µg/L;
- a precisão, avaliada pelo coeficiente de variação, resultante de seis extractos de padrão de concentração intermédia ronda os 20%. A percentagem de recuperação, avaliada por adição de padrão a diversas amostras é aproximadamente em média de 75%.

Conclui-se que o método implementado se revela adequado ao objectivo proposto.

Referências

- [1]-Oliva *et al.* 1999, *J. Chromatogr. A*, 833, 43-51.
- [2]-Cabras *et al.* 2000, *J. Agr. Food Chem.* 48 (4), 967-973.
- [3]- Cabras *et al.* 1998, *J of AOAC Int.* 81 (6), 1185-1189.

Agradecimentos: Os autores agradecem à FCT: Projecto POCTI/1999/AGR/34591.

P-47. Separação e Quantificação por HPLC de Doxiciclina, Tilosina e Bromexina em Pré-Misturas Medicamentosas para Animais

Maria Elisa Soares e Maria de Lourdes Bastos

CEQUP Laboratório de Toxicologia. Faculdade de Farmácia do Porto.
Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 PORTO

INTRODUÇÃO

As pré-misturas medicamentosas são formas farmacêuticas frequentemente usadas como veículo de medicamentos destinados a animais para consumo humano.

Entre os compostos mais vulgarmente incluídos nas pré-misturas encontram-se os antibióticos para tratamento ou prevenção de infecções que frequentemente são massivas nos modelos de produção intensiva hoje adoptados, resultando enormes prejuizos pela mortalidade ou morbilidade originadas. Para além deste efeito terapêutico, algumas destas moléculas exibem também efeitos promotores do crescimento como, por exemplo, a tilosina.

Uma das formas destinadas a uso veterinário a introduzir no mercado português contém a presença simultânea de doxiciclina, tilosina e bromexina, associando a acção antibacteriana dos dois primeiros à acção expectorante da última, tendo a tilosina também acção promotora do crescimento.

Entre outras exigências por parte das entidades reguladoras, as formas disponíveis no mercado devem ser controladas periodicamente quanto ao conteúdo das substâncias activas presentes e sua estabilidade (1). Do que nos foi dado observar na literatura, não existe um método validado que permita a determinação simultânea destes três fármacos em formas medicamentosas, havendo no entanto métodos disponíveis para a sua quantificação individualizada ou associada a outros compostos (2-4). São evidentes as vantagens da implementação e validação de um método único que permita a avaliação dos teores dos três compostos, nomeadamente a rapidez de análise e os mais baixos custos da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

1.- Amostra para análise

A amostra usada na implementação da técnica foi a pré-mistura na sua forma de comercialização, fornecida pela respectiva firma, bem como os padrões dos fármacos nela presentes.

2.- Extracção dos compostos

Os compostos foram extraídos com metanol, o extracto centrifugado e analisado por HPLC.

3.- Análise cromatográfica

A análise foi feita num cromatógrafo Hewlett Packard 1100 equipado com detector de UV, ligado a um computador MPC PII 450. A separação foi feita em coluna Waters Spherisorb ODS 2 com 5 micra de tamanho de partícula.

A fase móvel adoptada era constituída por solução aquosa de ácido oxálico 0,02 M e acetonitrilo (40+60) a um fluxo de 1,0 ml/min durante os primeiros 18 minutos, seguido de 1,8 ml/min até eluição dos três compostos. O comprimento de onda de detecção foi de 250 nm.

4.- Validação da técnica e aplicação

O estudo da recuperação dos compostos foi feito adicionando quantidades rigorosas e crescentes dos padrões a uma pré-mistura que não continha os fármacos em análise. Após extracção e análise cromatográfica verificou-se que a recuperação era superior a 95% para os três fármacos.

Nas condições analíticas estabelecidas os limites de detecção foram de 6 ng, 17 ng e 33 ng, para a doxiciclina, tilosina e bromexina, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica implementada de análise simultânea de doxiciclina, tilosina e bromexina permite o seu controlo na pré-mistura medicamentosa em tempo real, livres de compostos interferentes e com uma sensibilidade elevada, dispensando passos de concentração e de purificação prévios.

Os parâmetros obtidos na validação da técnica atestam a sua sensibilidade e a sua reproduutibilidade.

O método, após validação, foi aplicado à análise da pré-mistura medicamentosa pronta a comercializar, onde os compostos devem estar presentes na concentração de 10% para a doxiciclina e tilosina e 0,35% para a bromexina. Foram analisadas 5 alíquotas da mesma, tendo sido encontradas as concentrações de 10,3% para a doxiciclina, 10,4% para a tilosina e 0,37% para a bromexina.

Em conclusão, o método de análise que se apresenta é rápido, preciso, sensível e reprodutível, servindo portanto as exigências colocadas ao controlo de qualidade da pré-mistura medicamentosa contendo doxiciclina, tilosina e bromexina.

REFERÊNCIAS

- (1) Guia de Produtos Veterinários. Índice Nacional Veterinário. Série II, Ano VI. Promoarte, Lda, 1999/2000.
- (2) Monser, L., Darghouth, F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. *J. Chromatogr. Biom. Anal.*, **23**, 353-362, 2000.
- (3) Roets, E., Beirinckx, P., Quintens, I., Hoogmartens, J. Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **630**, 159-166, 1993.
- (4) Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Bravo, E. Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *J. Chromatogr. B*, **692**, 199-205, 1997.

P-48. Validação de um Método Cromatográfico para a Análise de Parabenos em Sistemas Farmacêuticos Líquidos

Teófilo Vasconcelos, Fernanda Bahia e Paulo Costa

Serviço de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

O Metilparabeno e o Propilparabeno são conservantes muito utilizados em preparação farmacêuticas. O objectivo deste trabalho foi validar um método analítico para a quantificação do metil e propilparabenos em ensaios de doseamento. A validação do método para a análise do metil e propilparabeno foi feita de acordo com o especificado nas ICH (Harmonised Tripartite Guidelines). Procedeu-se assim ao estudo da exactidão, precisão, especificidade, linearidade e amplitude. Estudaram-se também outros parâmetros relacionados com o procedimento cromatográfico, tais como o factor de capacidade, o factor de simetria, a resolução, 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. Como neste caso o procedimento analítico (cromatografia líquida) é ele próprio separativo, os cromatogramas não apresentaram qualquer outro pico com tempo 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 para a determinação do metilparabeno foi de 100,1% e para o propilparabeno foi de 100,4%. 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. A precisão de resposta do detector foi verificada injectando-se 3 réplicas de 5 diferentes concentrações. Para todas as concentrações o coeficiente de variação foi sempre inferior a 2%. A linearidade foi verificada preparando-se cinco concentrações diferentes, sendo as soluções analisados em quintuplicado. Construiram-se os gráficos resposta do detector *versus* concentração, desvios padronizados em relação à recta de regressão e resposta relativa *versus* log da concentração. Foram também 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). Esta linearização permitiu um bom ajuste entre o modelo teórico e os dados

obtidos como pode ser justificado através dos valores de R e R^2 . A **amplitude** é geralmente derivada a partir dos estudos de linearidade e depende do objectivo do método analítico. Deste modo, utilizou-se uma gama de concentrações alargada, espaçada de modo equilibrado, 28,3%, 58,5%, 81,6%, 113,9% e 140,9% do valor máximo esperado (1,8 mg/ml) para o metilparabeno, e de 27,0%, 47,0%, 72,5%, 102,0% e 146,0% da concentração máxima esperada (0,2 mg/ml) para o propilparabeno. Para um bom comportamento cromatográfico o **factor de retenção** (k') deve estar compreendido entre 1 e 20. Nas condições cromatográficas escolhidas o metilparabeno e o propilparabeno apresentaram um k' de 1,4 e de 3,9 respectivamente. A **resolução** (R_s) entre dois picos mede o grau de separação entre estes (devendo ser $R_s > 2$), tendo-se obtido neste caso um valor de 2,7 entre o metil e o propilparabeno. O **número de pratos teóricos** (N) mede a capacidade de uma coluna separar os componentes de uma amostra e deve em regra ser superior a 2000. O valor de N obtido com este método foi superior a 13000 para ambos os parabenos. A simetria ou assimetria de um pico cromatográfico pode ser quantificada através do **factor de simetria** ($f.s.$), sendo geralmente admitido como limite $f.s. \leq 2$. Nas condições cromatográficas ensaiadas, o $f.s.$ para aqueles parabenos foi de 1,14.

P-49. Determinação do Cloridrato de Dobutamina por HPLC – Comparação de um Método Interno COM UM Oficial – USP XXIV

R. Manadas e M. E. Pina

Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (UCQFarma)
Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
3000 Coimbra
Portugal

A dobutamina é um fármaco simpaticomimético com efeitos directos nos receptores adrenérgicos beta 1, o que lhe confere uma acção inotrópica sobre o coração. Este fármaco é usado para aumentar a contractilidade do coração no colapso cardíaco bem como no enfarte do miocárdio. Outra circunstância na qual a sua actividade inotrópica pode ser útil é durante a cirurgia cardíaca. A dobutamina é administrada sob a forma de cloridrato, sendo as doses expressas relativamente à base.

No presente trabalho, são apresentados dois métodos (um desenvolvido no laboratório e um oficial – USP XXIV) de HPLC para análise da dobutamina em solução injectável.

O sistema cromatográfico (marca Shimadzu) é composto por uma bomba, um detector UV-Vis, um sistema de mistura de solventes e um injector manual de 20 μ L. O controlo do sistema cromatográfico, o registo dos dados e a sua análise é feita informaticamente através do software do equipamento.

Na técnica desenvolvida no laboratório, utilizou-se uma coluna RP-18 Lichrospher 100 (12,5 x 0,46cm) com partícula de 5 μ m. A fase móvel é composta por KH₂PO₄ 0,05M (pH = 4,4) e metanol (75:25 – v/v). O fluxo foi de 1ml/min.

No método proposto pela USP XXIV utiliza-se uma coluna RP-18 (25 x 0,46cm) com partícula de 5 μ m de tamanho. A fase móvel é constituída por uma solução de par iónico (ácido 1-octanossulfônico – sal sódico, trietilamina e ácido fosfórico para acertar o pH = 2,5), acetonaítrilo e metanol (58:28:14 – v/v). O fluxo usado foi de 1ml/min.

Em ambos os processos a quantificação foi realizada pelo método do padrão externo ao comprimento de onda de 280nm e à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos evidenciam uma boa linearidade, repetibilidade e precisão intermédia para o método interno e satisfazem todos os requisitos do método USP.

O método desenvolvido no laboratório apresenta várias vantagens na análise de rotina, nomeadamente fase móvel menos dispendiosa e de mais fácil preparação, coluna mais económica e tempos de eluição mais curtos. Este método carece de validação para ser implementado, sendo esta uma desvantagem a considerar.

Para o controlo de qualidade de rotina, o método interno revela-se, pelas vantagens referidas, mais rentável e menos oneroso.

P-50. Análise de Compostos Fenólicos por HPLC na Diferenciação de Aguardentes *Lourinhã* Envelhecidas em Madeira de Carvalho Nacional de Diferentes Origens Geográficas

Canas, S.¹; Mateus A.M.¹; Belchior A.P.¹; Spranger M.I.¹; Bruno-de-Sousa R.²

¹Estação Vitivinícola Nacional. INIA. 2565-191 DOIS PORTOS. Portugal.

²Instituto Superior de Agronomia - Departamento de Química Agrícola e Ambiental. Tapada da Ajuda. LISBOA. Portugal

O envelhecimento em madeira é fundamental para obtenção de aguardentes de qualidade. A madeira de carvalho (*Quercus sp.*) apresenta elevada aptidão para este fim, quer pelas suas propriedades físicas e mecânicas quer pela sua composição química [1]. Na última década, diversos trabalhos efectuados em carvalhos franceses e americanos [2-6], têm contribuído para sustentar a importância atribuída à origem geográfica como factor determinante dos teores de compostos extractíveis da madeira. Num estudo recente [7] foi confirmada a influência deste factor na composição fenólica de madeira de carvalho nacional, tradicionalmente utilizada no fabrico de vasilhas para o envelhecimento de aguardentes.

No presente trabalho recorre-se igualmente à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizando um método optimizado e validado para análise dos principais compostos fenólicos de baixo peso molecular (ácidos gálico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) [8], para avaliar a repercussão da origem geográfica numa aguardente *Lourinhã*, ao fim de quatro anos de envelhecimento na madeira anteriormente estudada - carvalho nacional (*Quercus pyrenaica* Willd.) de três regiões (E, F, G) do Norte de Portugal.

Os resultados obtidos (Quadro I) evidenciam a possibilidade de diferenciação das aguardentes com base nos teores em compostos fenólicos de baixo peso molecular. Neste sentido, importa destacar o carácter mais discriminante dos ácidos fenólicos, designadamente os ácidos gálico, vanílico, ferúlico e elágico.

Verifica-se ainda que a combinação dos compostos responsáveis pela diferenciação das madeiras entre si – ácido siríngico, ácido elágico e aldeídos fenólicos [7] é diferente da que se encontra implicada na distinção das aguardentes respectivas.

Quadro I - Teores médios de compostos fenólicos (mg/l A.P.) de aguardentes envelhecidas em quartolas de carvalho nacional de diferentes proveniências

Efeito	ac. gal	ac. van	ac. sg	ac. fer	ac. elg	vanil	sgald	cfald	snald
	**	*	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CNE	x 24,86a	8,70a	6,91	6,11a	84,17a	8,23	19,17	8,47	16,53
	s 7,06	3,81	4,25	1,32	39,11	5,56	15,72	5,74	15,22
CNF	x 38,71b	9,20ab	6,08	7,21b	95,38ab	8,77	19,82	9,30	17,83
	s 8,14	2,52	2,93	2,01	36,17	4,12	12,08	5,04	14,04
CNG	x 47,11c	10,31b	7,82	9,80c	104,21c	9,04	20,05	8,90	18,16
	s 14,33	2,64	3,84	2,88	37,57	4,45	12,96	5,40	15,09

x = média de 9 valores; s = desvio padrão; n.s. = efeito não significativo; médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P=95%) ou muito significativa (P=99%)

Com base nestas constatações, poder-se-á deduzir que o impacto da origem geográfica na composição química da aguardente, relativamente à madeira em que está a ser envelhecida, tende a sofrer alguma atenuação. Tal facto poderá resultar da intervenção de outros factores, particularmente os associados ao processo de fabrico das vasilhas (como o tratamento térmico) e ao envelhecimento propriamente dito (como a temperatura, a humidade, o teor alcoólico e o teor de oxigénio). Existe, contudo, uma coerência bastante interessante em termos de composição química de madeiras (Canas et al., 2000) e respectivas aguardentes, que assenta na relação CNG>CNF>CNE, com CNE e CNF a apresentarem maior semelhança, para a generalidade dos compostos analisados.

Referências

- [1] Mosedale J.R. (1995). *Forestry*, **68** (3), 203-230
- [2] Keller R. (1992). *J. Intern. Sci. Vigne Vin*, número special, 7-28
- [3] Miller D.P., Howell G.S., Michaelis C.S., Dickmann D.I. (1992). *Am.J.Enol.Vitic.*, **43**, 333-338
- [4] Marco J., Artajona J., Larremi M.S., Rius F.X.(1994). *Am.J Enol.Vitic.*, **45**, 192-200
- [5] Mosedale J.R., Ford A. (1996). *J.Sci.Food Agric.*, **70**, 273-287
- [6] Chatonnet P., Dubourdieu D.(1998). *Am.J.Enol.Vitic.*, **49**, 79-85
- [7] Canas S., Leandro M.C., Spranger M.I., Belchior A.P. (2000). *Holzfor.*, **54** (3), 255-261
- [8] Canas S., Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2001) (em publicação)

P-51. Análise de Aguardente de Medronho por HPLC e Electroforese Capilar

V.R. Almeida¹, L.R. Galego¹, M.R. Bronze^{2,3}, L. Vilas Boas^{3,4}

¹Escola Superior de Tecnologia da Univ. do Algarve, Campus da Penha, 8000 Faro

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras

³Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1600 Lisboa

⁴Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1096 Lisboa

INTRODUÇÃO

A aguardente de medronho (medronheira) é produzida no Algarve nas zonas de Serra e tem denominação de origem reconhecida. Em trabalhos anteriores [1] foram estudadas as condições de optimização do seu processo de fabrico.

Na preparação de aguardente envelhecida, o estágio na madeira extrai alguns compostos fenólicos, nomeadamente aldeídos benzóicos e cinâmicos, os quais podem ser analisados por cromatografia líquida de alta eficiência e por electroforese capilar.

Após análise de aguardentes vínicas [2] e validado o método de análise dos aldeídos sinapinaldeído, coniferaldeído, siringaldeído e vanilina [3] por electroforese capilar a técnica foi aplicada no estudo de aguardente de medronho.

Neste trabalho foram comparados os resultados obtidos após análise por cromatografia líquida e electroforese capilar das amostras de aguardentes de medronho com diferentes tempos de estágio em madeira de carvalho.

EXPERIMENTAL

Equipamento e Condições de Análise: Os compostos fenólicos nestas amostras foram analisados por electroforese capilar (Lauerlabs, Prince) com detecção no UV-vis a 254 nm. A amostra foi introduzida no capilar de sílica ($l = 70$ cm e d.i. = 75 μm) por aplicação de 10 mBar de pressão durante 12 s. A separação ocorreu a 35°C, quando se aplicou um potencial de 25kV ($I = 19.3\mu\text{A}$), tendo sido utilizada uma solução tampão 0,01 M de tetraborato a pH= 9.2. Entre cada amostra procedia-se à lavagem do capilar de acordo com condições já descritas [2].

As amostras também foram analisadas por HPLC num equipamento UNICAM equipado com injector automático, bomba quaternária e detector de diódios. Foi utilizada uma coluna Lichrospher, RP-18, 5 μm (Merck), e uma pré-coluna com o mesmo enchimento. Foram utilizados os seguintes eluentes A - ác. fosfórico 0,15% B - ác. fosfórico 0,15%, metanol 60%, água 40% 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, o fluxo era 0,7 ml/min e a temperatura da coluna 35°C.

Amostras: Foram analisadas amostras de aguardente de medronho (A-H) produzidas no âmbito do projecto PAMAF 8005. Estas amostras de aguardente de medronho de 8 produtores diferentes foram armazenadas em barris de madeira de carvalho de 50L, previamente sujeitos a queima média e foram recolhidas amostras após 3, 6, 9, 12 e 15 meses de contacto com a madeira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aguardente de medronho foram todas analisadas por cromatografia líquida e electroforese capilar. Como os mecanismos de separação das duas técnicas são diferentes a ordem de eluição/migração dos compostos também difere.

Na figura 1 compararam-se os perfis resultantes da amostra B ao longo de 15 meses de tempo de envelhecimento.

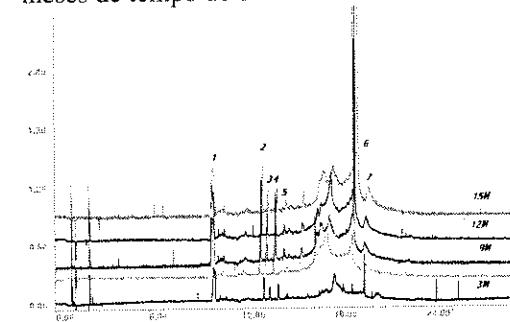


Figura 1. Electroforegramas da aguardente de medronho B (3, 6, 9, 12, 15 meses). Legenda: 1. compostos neutros (principalmente furfural e 5-HMF), 2. sinapinaldeído, 3. coniferaldeído, 4. siringaldeído, 5. vanilina; 6. não identificado; 7. ácido gálico

O conjunto de resultados obtidos pelas duas técnicas foi sujeito a análise por componentes principais de modo a facilitar a comparação entre as várias amostras.

O gráfico correspondente à projecção das amostras analisadas por EC no espaço definido pelas 3 primeiras componentes principais mostrava que, considerando os picos assinalados na figura 1, tinha ocorrido uma evolução das amostras ao longo do tempo. O resultado era comparável ao obtido na análise por cromatografia líquida (HPLC).

A amostra B distingua-se das restantes por apresentar teores superiores de furfural e inferiores de ácido gálico.

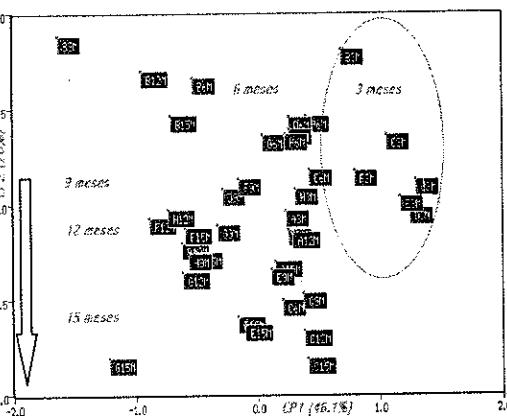


Figura 2. Projecção das amostras no espaço definido pelas duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2)



REFERÊNCIAS

- [1] L.R. Galego, A.N. Martins, V.R. Almeida, G. Versini, 1995, EuroFood ChemVIII, Áustria.
- [2] M.R. Bronze, L. Vilas-Boas, *Analusis*, 1998,26, 40-47.
- [3] M.R. Bronze, L. Vilas-Boas, A.C. Martins, M.C. Patrício, 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, 1999.



P-52. Nectares de Pêra: Perfis Cromatográficos e Comparação com os Resultados da Avaliação Sensorial

Rodrigo Feliciano¹, Antero Ramos², M. Rosário Bronze^{1,2}

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

1. INTRODUÇÃO

O consumo de néctares aumentou significativamente nos últimos anos encontrando o consumidor uma vasta gama de marcas à sua disposição.

As características químicas e sensoriais deste tipo de produtos dependem da matéria prima utilizada e do seu processo de fabrico. A nível nacional a variedade de pêra mais vulgarmente usada para a produção de néctares é a pêra Rocha, mas muitas marcas produzidas noutras países, nomeadamente Espanha utilizam outras variedades de pêra.

A comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise dos néctares por cromatografia gasosa associada a microextracção em fase sólida (MEFS-CG) e cromatografia líquida (HPLC), pode mostrar algumas diferenças qualitativas e quantitativas entre os perfis as quais podem ser responsáveis por diferentes características organolépticas detectadas nesses produtos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Amostras de néctar de pêra correspondentes a 8 marcas comerciais foram analisadas por HPLC utilizando uma coluna de fase reversa RP-18 e um gradiente de eluentes constituído por acetonitrilo e ácido fosfórico. Para a análise dos compostos voláteis procedeu-se à concentração prévia dos compostos voláteis presentes no espaço de cabeça em contacto com a amostra, utilizando uma fibra (Supelco, Inc. 50/30 µm; polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/Carboxeno) para MEFS (microextracção em fase sólida) e posterior análise por CG-EM. O sistema de aquisição e tratamento de dados utilizado foi o Class5K (Shimadzu) e a biblioteca de espectros utilizada foi a NIST62.

Na avaliação sensorial dos néctares foram utilizadas 20 pessoas que fazem parte do pessoal do laboratório e que foram sujeitas a testes de selecção. Efectuaram-se provas para determinar as preferências e provas de ordenação da intensidade das características sensoriais dos néctares de pêra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos perfis cromatográficos obtidos na análise das amostras de néctares (A-H), mostrava algumas diferenças.

A figura ilustra os resultados para 4(A-D) das amostras em estudo, correspondendo (a) aos perfis obtidos por HPLC com detecção a 280 nm, comprimento de onda de correspondente à detecção dos compostos fenólicos e (b) aos perfis obtidos por MEFS-CG-EM, tendo sido feita a identificação de alguns dos compostos. A maioria dos compostos que no cromatograma (a) aparecem com tempos de retenção superiores a 36 min são detectados a 400nm (a.2), pelo que poderão contribuir para a cor dos respectivos néctares.

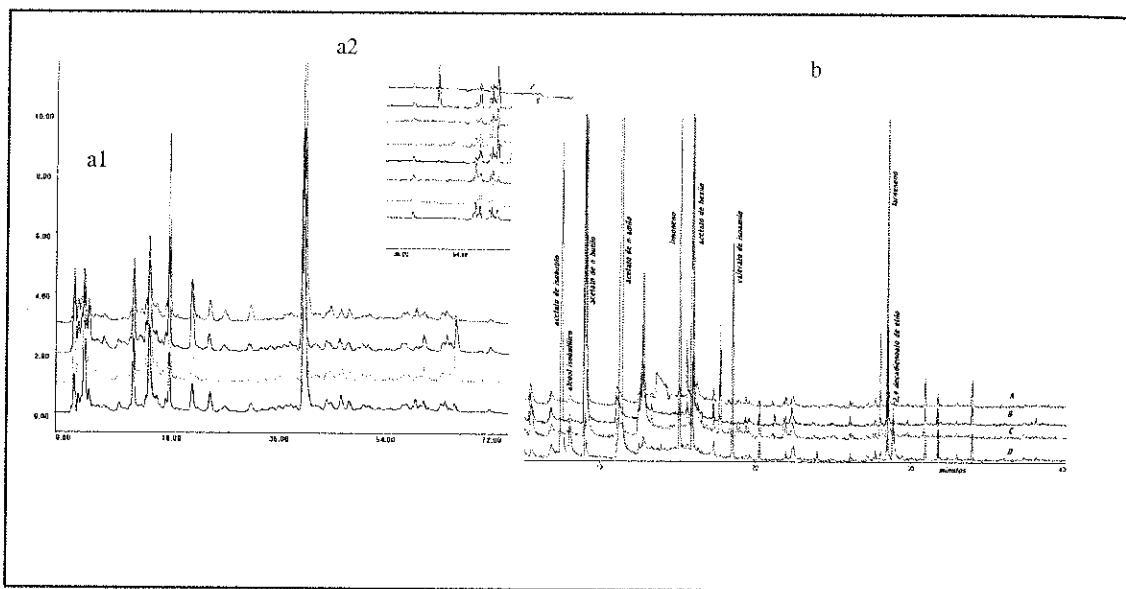


Figura. Perfis cromatográficos obtidos após análise por: (a) HPLC com detecção a 280nm (a.1) e 400nm (a.2); (b) MEFS-CG-EM, de várias amostras de néctares de pêra

A avaliação sensorial dos néctares mostrava que o néctar D era o mais pontuado relativamente a odor e *flavour* mais intenso, o qual, segundo alguns dos provadores, parecia não ser só a pêra. A análise por MEFS-CG-EM mostrava que o perfil desta amostra se afastava do perfil das outras amostras analisadas nas mesmas condições.

Relativamente à análise por HPLC do néctar D não se observavam grandes diferenças entre os perfis, embora alguns compostos estivessem presentes em maiores concentrações, nomeadamente o 5-HMF. Esta amostra era também a que apresentava uma coloração mais intensa que era preferida pelos provadores.

Os resultados obtidos após a análise por cromatografia das várias amostras de néctares de pêra foram submetidos análise multivariável análise por componentes principais (ACP) e concluiu-se acerca da importância das análises efectuadas na contribuição para a diferenciação entre as amostras do ponto de vista sensorial.

P-53. Comparação de Perfis Cromatográficos de Tomates e Produtos Derivados

Cláudia Santinho¹, M.R. Bronze^{2,3}, L. Vilas Boas^{2,4}

¹Estação Agronómica Nacional, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

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

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

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

O tomateiro (*Lycopersicum esculentum* P. Miller) é uma hortícola que apresenta um elevado número de variedades que podem ser usadas para consumo em fresco ou processamento industrial, de acordo com as suas características externas (forma, tamanho, cor) e internas (sabor, textura, firmeza).

Do ponto de vista do consumidor, é muito importante assegurar a uniformidade da qualidade dos produtos processados de tomate, bem como do próprio tomate comercializado em fresco. A preferência do consumidor é influenciada principalmente pela aparência do fruto, consistência, flavor e aspectos nutricionais.

A fracção volátil do tomate é constituída por várias centenas de compostos embora só uma parte desse compostos sejam responsáveis pelo aroma dos frutos ou dos produtos derivados e contribuindo assim para a sua qualidade.

Este trabalho teve como objectivo obter e comparar perfis cromatográficos dos componentes voláteis tendo em vista facilitar a programação dos trabalhos de avaliação de qualidade por meio de análise sensorial para os produtos frescos e processados.

Materiais e Métodos

As amostras usadas neste estudo incluíam cultivares de tomate para indústria (Perfect Peel) e para consumo em fresco (tipo 'Cacho' e tipo 'Cereja'), uma marca comercial de tomate enlatado inteiro e duas de polpa de tomate em embalagem Tetrapak. As amostras de tomate Perfect Peel foram colhidas em campos experimentais localizados nas zonas de Vila Franca de Xira e de Azambuja, enquanto as de tomate para consumo em fresco foram obtidas no mercado local.

Cada amostra de tomate (cerca de 30 g) foi introduzida em frasco estanque e procedeu-se à concentração dos compostos voláteis existentes no espaço de cabeça por microextracção em fase sólida (60 min à temperatura ambiente) utilizando-se uma fibra Supelco

(Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno/Carboxeno). As análises cromatográficas foram realizadas por CG-MS (Shimadzu QP-5000) equipado com uma coluna J&W 1701P de 30 m.

Resultados e Discussão

A comparação dos perfis da cultivar Perfect Peel proveniente de 2 campos experimentais que diferiam quanto ao tipo de solo e práticas culturais aplicadas (fertilizações, regas, produtos fitofarmacêuticos) permitiu verificar diferenças apreciáveis nas concentrações de heptanal, terpinoleno, 2-pentilfurano, limoneno, 2-isobutiltiazol, trans-2-octenal e cis-6,10-dimetil-5,9-undecadieno-2-onal que eram maiores numa das amostras, enquanto na outra predominava o trans-2-hexenal, 1-nitropentano e cis-3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ol. Assim, é previsível que estes frutos apresentem características sensoriais diferentes pois aqueles compostos fazem parte do conjunto de compostos voláteis que mais contribuem para o aroma em tomate fresco.

Comparando o perfil cromatográfico duma polpa de tomate com o do tomate (Perfect Peel), verificou-se a presença de sulfureto de dimetilo, acetato de etilo, 3-metilbutanal, 1-octeno, benzeneacetaldeído, 2-furancarboxaldeído na polpa. Em contrapartida, o perfil correspondente ao tomate mostrava uma maior quantidade de hexanal, heptanal, limoneno, 2-isobutiltiazol, trans-2-octenal, e cis-6,10-dimetil-5,9-undecadieno-2-onal.

No caso dos produtos derivados de tomate, as condições de processamento com destaque para as elevadas temperaturas vão causar alterações apreciáveis na composição da fracção volátil pelo que faz sentido avaliar a contribuição relativa dos componentes presentes nas matérias primas e os formados durante o processamento para as características sensoriais e qualidade destes produtos.

Agradecimento

Este trabalho decorre no âmbito do projecto PARIPIDI B/INIA.

Referências

A. Krumbein, D. Ulrich, in "Flavour Science. Recent Developments", (Eds. A.J. Taylor, D.S. Mottram), 289-292, 1996.