

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

TESE

**MELHORIA E IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE
ANÁLISE DE ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Sidney Pacheco

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**MELHORIA E IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE
DE ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

SIDNEY PACHECO

Sob a orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Seropédica, RJ
Abril de 2014

664.07

Pacheco, Sidney, 1972-

P116m

T

Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência / Sidney Pacheco. - 2014.

161 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014.

Bibliografia: f. 127-147.

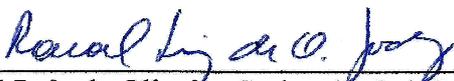
1. Alimentos - Análise - Teses. 2. Análise cromatográfica - Teses. 3. Cromatografia a líquido - Teses. 4. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

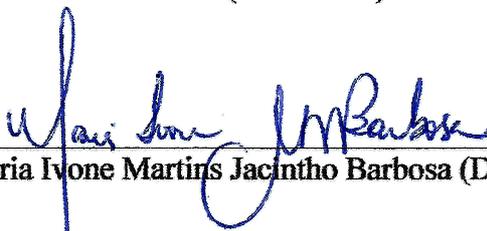
SIDNEY PACHECO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos.

TESE APROVADA EM 30 DE ABRIL DE 2014



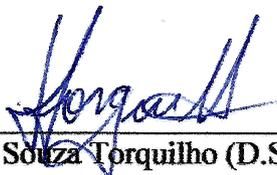
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)



Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa (D.Sc.) UFRRJ



Rosires Deliza (D.Sc.) UFRRJ / Embrapa CTAA



Helena de Souza Torquillo (D.Sc.) IFRJ-Nilópolis



Alexandre Porte (D.Sc.) UNIRIO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, mais uma vez pela orientação e amizade.

À Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa e Lucimar Storck Teixeira, pelos esforços e empenho dispensados na coordenação do curso.

À Dra. Renata Galhardo Borguini, pela colaboração e incentivo.

Ao Dr. Marcelo da Costa Souza, pelas identificações botânicas e orientações para as coletas de plantas.

Aos parceiros de bancada e cromatógrafo:

Carolina Passos da Cunha, Heitor Daguer e Ilana Felberg nas análises de isoflavonas.

Julia Hauck Tiburski e Bruna Luiza Ferreira de Brito nas análises de carotenoides.

Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento nas análises de aminoácidos, carotenoides, isoflavonas...

Leílson de Oliveira Ribeiro e Davy Hidalgo Chávez nas análises de ácidos fenólicos.

Robson Lopes Abreu nas análises de hidroxiprolina e hipoxantina.

Sabrina da Costa Silva Andrade nas análises de nucleotídeos.

Aos colegas de laboratório e sala de aula:

Manuela Cristina PDA Santiago, Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa, Fernanda Marques Peixoto, Cláudio Roberto Ribeiro Bobeda, Daniel Filisberto Schulz, Luciana Mouta de Oliveira, Elaine Cristina de Oliveira Braga Só, Allien Monique Rosa Machado, Victor de Carvalho, Beatriz Cristina Luna de Melo e todos os demais que injustamente não recordei neste momento, mas de modo algum com menor importância.

Plantae

As mais incríveis combinações de formas e cores
As mais elaboradas essências
Os mais diversificados sabores
e as mais refinadas relações interespecíficas
são protagonizados por seres desprovidos
de visão, olfato, paladar, tato e audição

Lutécio, Zoé, Adriana e Melina

Pai, mãe, esposa e filha.

Dedico.

RESUMO

PACHECO, Sidney. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência**. Seropédica: UFRRJ, 2014. 147p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos). Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A cromatografia líquida foi inventada há mais de 100 anos e, apesar de ter passado por um período de dormência, acabou por se tornar a principal ferramenta analítica da atualidade. A evolução da parte instrumental e da tecnologia de preparo de fases estacionárias vem multiplicando ainda mais as aplicações da técnica. Métodos analíticos cada vez mais sensíveis e rápidos são a principal demanda aos analistas. Na ciência de alimentos não poderia ser diferente, a cromatografia líquida é a base analítica para centenas de metodologias, como a análise de aminoácidos, carotenoides, flavonoides, contaminantes entre outras. Uma das maiores dificuldades para os analistas que fazem uso desta ferramenta é a obtenção de padrões de qualidade, muitas substâncias em alguns casos sequer estão disponíveis comercialmente ou não são estáveis o suficiente para armazenamento. O objetivo deste trabalho é implantar e aperfeiçoar métodos cromatográficos para a análise de substâncias de interesse para a ciência de alimentos em matrizes alimentícias. Além disso, desenvolver metodologia cromatográfica para a purificação destas substâncias para posterior utilização como padrões analíticos. Foram obtidas diversas substâncias puras a partir de matrizes naturais, como carotenoides, flavonoides e vitaminas. Todas com pureza acima de 90% e em quantidades suficientes para a sua caracterização e utilização como padrões analíticos. A utilização da própria cromatografia líquida em escala analítica se mostrou eficiente na obtenção destas substâncias em quantidades suficientes. Foram implantados e melhorados métodos cromatográficos para a determinação de aminoácidos, com aplicações para a quantificação da qualidade proteica de alimentos, dosagem de colágeno em carnes e a quantificação de contaminantes como a histamina. Um método para análise de isoflavonas em soja e seus derivados também foi implantado e aperfeiçoado, uma aplicação do método foi demonstrada para a detecção de fraude em carnes por adição de proteína vegetal. Diversos carotenoides foram isolados, mesmo os carotenoides minoritários, o que contribui para a correta avaliação da capacidade pró-vitáminica A dos alimentos. Cinco novas fontes de carotenoides de grande interesse para a saúde humana foram descobertas e quantificadas. Diversas metodologias, que representam um grande volume de rotina analítica, foram aperfeiçoadas com os principais objetivos de reduzir os tempos de análise, o uso de reagentes e, conseqüentemente, o impacto ambiental, através da menor geração de resíduos. O tempo de corrida do método cromatográfico de determinação de bixina e norbixina foi reduzido em 55%, do método de isoflavonas foi reduzido em 73% e do método de metilxantinas em 67% em relação aos métodos até então utilizados pelo Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, o que trouxe grande ganho de tempo, sensibilidade e menor geração de resíduos.

Palavras-chave: Cromatografia líquida; Padrão cromatográfico; Análise de alimentos; Carotenoides; Flavonoides; Aminoácidos; Xantinas.

ABSTRACT

PACHECO, Sidney. **Improvement and implementation of analytical methods for food analysis by high performance liquid chromatography**. Seropédica: UFRRJ, 2014. 147p. (Thesis, Doctor of Science and Food Technology, Food Science). Institute of Technology, Postgraduation Program in Science and Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Liquid chromatography was invented more than 100 years ago, and despite having gone through a period of dormancy, eventually became the main analytical tool nowadays. The evolution of the instrumental and the preparation of stationary phases technology multiplies further applications of the technique. More sensitive and rapid analytical methods are the main demand to analysts. In the food science could not be different, liquid chromatography is the analytical basis for hundreds of methods, such as analysis of amino acids, carotenoids, flavonoids, and contaminants. A major difficulty for analysts to use this tool is to obtain quality standards, many substances in some cases are even commercially available or are not stable enough for storage. The objective of this work was to develop and optimize chromatographic methods for analysis of substances of interest to the food science. Also, to develop chromatographic method for purifying these substances for subsequent use as analytical standards. Several pure substances were obtained from natural matrices, such as carotenoids, flavonoids and vitamins. All with purity above 90% and sufficient for their characterization and use as analytical standards. The use of liquid chromatography in analytical scale proved effective in obtaining sufficient quantities of these substances. It was implanted and improved chromatographic methods for the determination of amino acids, with applications for quantifying the quality of the food protein, measurement of collagen in meat and quantification of contaminants such as histamine. A method for analysis of isoflavones in soybean and its products had also been implemented and optimized; the application of the method was demonstrated for the detection of fraud in meat by the addition of vegetable protein. Various carotenoids were isolated, even minority carotenoids, which contribute to the correct evaluation of pro-vitamin A food capacity. Five new sources of carotenoids of great interest to human health have been discovered and quantified. Several methodologies, which represent a large volume of analytical routine, were improved with the main objective to reduce the analysis time, the use of reagents and hence the environmental impact through less waste generation. The run time of chromatographic method of bixin and norbixin determination was reduced by 55%, the method of isoflavones was reduced by 73% and 67% for methylxanthines method. Considering all methods previously used at the Embrapa Food Technology Liquid Chromatography Laboratory, the improvements brought great gain of time, sensitivity and less waste.

Key words: Liquid chromatography; chromatographic Standard; Analysis of food; Carotenoids, Flavonoids, Amino Acids; Xanthines.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- AccQ.Tag** – Nome comercial do *Kit* de derivatização para aminoácidos fornecido pela Waters®.
- ALA** – Aminoácido alanina.
- AOAC** – Associação norte americana que publica métodos oficiais para análises químicas e microbiológicas (*AOAC International*).
- AQC** – Derivatizante para aminoácidos: 6-aminoquinolilsuccimidilcarbamato.
- ARG** – Aminoácido arginina.
- ASP** – Aminoácido ácido aspártico.
- ATP** – Adenosina trifosfato.
- BHT** – Antioxidante di-*tert*-butil metil fenol.
- C₁₈** – Fase estacionária reversa octadecilsilano.
- C₃₀** – Fase estacionária com estrutura alifática de 30 carbonos ligada ao grupo silanol.
- C₈** – Fase estacionária reversa octilsilano.
- CG** – Cromatografia gasosa.
- CIAT** - Centro Internacional de Agricultura Tropical da Colômbia.
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência.
- CLUE** - Cromatografia líquida de ultra eficiência.
- CYS** – Aminoácido cisteína.
- DAD** – Detector de arranjo de diodos.
- FMOC-Cl** - Derivatizante para aminoácidos: 9-fluorenilmetil-cloroformato.
- GLP** – Gás liquefeito de petróleo.
- GLU** – Aminoácido ácido glutâmico.
- GLY** – Aminoácido glicina.
- H₃PO₄** – Ácido fosfórico.
- HBr** – Ácido bromídrico.
- HCl** – Ácido clorídrico.
- HIS** – Aminoácido histidina.
- ILE** – Aminoácido isoleucina.
- LEU** – Aminoácido leucina.
- LYS** – Aminoácido lisina.
- M** – Unidade de concentração molar.
- MET** – Aminoácido metionina.
- mL** - Unidade de volume: mililitro (10⁻³L).
- mL/h** – Unidade de fluxo: mililitros por hora.
- mL/min** – Unidade de fluxo: mililitros por minuto.
- N₂** – Gás nitrogênio.
- NaOH** – Hidróxido de sódio.
- NH₃** – Amônia.
- NHS** – Produto da hidrólise do AQC.
- OPA** – Derivatizante para aminoácidos: ortoftaldeído.
- PA** – Grau de pureza de produtos químicos: para análise.
- PHE** – Aminoácido fenilalanina.
- PITC** – Derivatizante para aminoácidos: fenilisotiocianato.
- PRO** – Aminoácido prolina.
- PSI** – Unidade de pressão libra força por polegada quadrada.
- SER** – Aminoácido serina.
- SIFA** - Derivatizante para aminoácidos: O-acetato-N-hidroxisuccimidil-fluoreseína.
- THR** – Aminoácido treonina.
- TOF** - Detector de massas de tempo de voo.
- t_R** – Tempo de retenção.
- TYR** – Aminoácido tirosina.
- µL** – Unidade de volume: microlitro (10⁻⁶L).
- µm** – Unidade de comprimento: micrometros (10⁻⁶m).
- VAL** – Aminoácido valina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1	História da cromatografia.....	03
2.1.1	Primeiros relatos de fenômenos relacionados à cromatografia.....	03
2.1.2	As imagens auto formadas de Runge.....	04
2.1.2.1	Biografia de Friedlieb Ferdinand Runge.....	05
2.1.2.2	Os livros de Runge.....	06
2.1.3	A contribuição de Schönbein.....	10
2.1.4	A contribuição de Goppelsroeder.....	11
2.1.5	A invenção da cromatografia.....	12
2.1.5.1	Biografia de Mikhail Semenovitch Tswett.....	12
2.1.5.2	Relatório preliminar de Tswett publicado em 1903.....	13
2.1.5.3	As publicações de 1906.....	15
2.1.5.4	O aparato cromatográfico de Tswett.....	16
2.1.5.5	As publicações de 1910 e 1911.....	17
2.1.5.6	Considerações sobre os experimentos de Tswett.....	18
2.1.6	Utilização e evolução da cromatografia nos anos pós Tswett.....	20
2.1.6.1	A contribuição de Charles Dhéré.....	20
2.1.6.2	A contribuição de Leroy Sheldon Palmer.....	22
2.1.6.3	A redescoberta da cromatografia de Tswett.....	24
2.1.7	A cromatografia em camada delgada.....	24
2.1.8	A cromatografia gasosa.....	24
2.1.9	A contribuição de Tiselius e Claesson.....	25
2.1.9.1	A cromatografia de deslocamento.....	26
2.1.9.2	Encontro para discussão de análises cromatográficas: <i>The Faraday Society</i>	26
2.2	A contribuição de Moore e Stein.....	26
2.2.1	Biografia de Stanford Moore e Willian H. Stein.....	27
2.2.2	A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de amido.....	28
2.2.3	A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de troca iônica.....	31
2.2.3.1	A contribuição de Partridge.....	31
2.2.3.2	Moore e Stein adotam as colunas de resinas de troca iônica.....	32
2.2.4	Aplicações analíticas da separação cromatográfica em colunas de troca iônica..	34
2.2.5	O cromatógrafo de Moore e Stein.....	35
2.2.5.1	Sistemas de bombeamento.....	36
2.2.5.2	Reservatórios para as fases móveis.....	37
2.2.5.3	Sistema de deaeração das fases móveis.....	37
2.2.5.4	Colunas cromatográficas.....	38
2.2.5.5	Reator para derivatização com ninidrina.....	38
2.2.5.6	Fotômetro para detecção em linha.....	39
2.2.5.7	Registrador automático.....	40
2.2.6	Resumo sobre as contribuições de Stein e Moore para a cromatografia líquida..	41
2.3	“Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia).....	41
2.4	A instrumentação comercial.....	43

2.5	A evolução das fases estacionárias para cromatografia líquida.....	43
2.5.1	Colunas com partículas superficialmente porosas (coreshell).....	44
2.5.2	Colunas monolíticas.....	45
2.5.3	Coluna de fase reversa C ₃₀	46
2.5.4	Colunas com partículas inferiores a 2µm.....	46
2.6	Aplicação da cromatografia líquida na análise de alimentos.....	47
2.6.1	A evolução da análise de aminoácidos após Moore e Stein.....	47
2.6.1.1	Derivatização com o-Ftalaldeído (OPA).....	48
2.6.1.2	Derivatização com Fluorescamina.....	49
2.6.1.3	Derivatização com Cloreto de Dansila.....	50
2.6.1.4	Derivatização com 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl).....	50
2.6.1.5	Derivatização com Fenilisotiocianato (PITC).....	51
2.6.1.6	Derivatização com 6-aminoquinolil-N-succinimidil carbamato (AQC).....	53
2.6.1.7	Derivatização com O-acetato-N-hidroxisuccinimidil-fluoreseína (SIFA).....	55
2.6.1.8	Diversificação de métodos analíticos para detecção de aminoácidos.....	55
2.6.2	Métodos de hidrólise de proteínas para análise de aminoácidos.....	56
2.6.2.1	Hidrólise ácida.....	56
2.6.2.2	Hidrólise alcalina para quantificação do triptofano.....	56
2.6.2.3	Oxidação com ácido perfórmico para aminoácidos sulfurados.....	57
2.6.3	Carotenoides.....	58
2.6.3.1	Carotenoides pró-vitamina A.....	59
2.6.3.2	Carotenoides importantes para a visão.....	59
2.6.3.3	Licopeno.....	59
2.6.3.4	Outros carotenoides de interesse.....	59
2.6.4	Substâncias fenólicas.....	60
2.6.4.1	Ácidos fenólicos.....	61
2.6.4.2	As isoflavonas.....	62
2.6.5	Xantinas.....	63
2.6.5.1	A cafeína.....	64
2.6.5.2	Teofilina e a teobromina	64
2.6.5.3	Hipoxantina e a degradação do ATP.....	65
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3.1	Execução da parte experimental.....	66
3.2	Obtenção de padrões analíticos por cromatografia líquida em escala analítica...	66
3.2.1	Coleta manual do efluente da coluna cromatográfica.....	66
3.2.2	Coleta automatizada do efluente da coluna cromatográfica.....	67
3.2.3	Metodologia e matrizes utilizadas para isolamento dos padrões.....	67
3.2.4	Verificação da pureza das substâncias isoladas.....	67
3.2.5	Quantificação, preparo das soluções padrão e construção das curvas analíticas..	68
3.3	Métodos de extração e análise de carotenoides.....	69
3.3.1	Isolamento de zeinoxantina e β-criptoxantina.....	70
3.3.2	Isolamento de <i>cis</i> -licopeno.....	70
3.3.3	Isolamento de <i>cis</i> -β-caroteno.....	71
3.3.4	Isolamento de α-caroteno e β-caroteno.....	71
3.3.5	Novas fontes para isolamento de carotenoides.....	71
3.3.6	Métodos de extração e análise de bixina e norbixina.....	72
3.4	Métodos de extração e análise de ácidos fenólicos.....	72

3.5	Extração, hidrólise, isolamento e análise de isoflavonas em soja.....	74
3.5.1	Aplicação do método para detecção de fraude por adição de soja em carnes.....	74
3.5.2	Implantação de método rápido para análise de isoflavonas por CLAE.....	75
3.6	Extração, isolamento e análise de retinol.....	75
3.7	Análise de aminoácidos.....	75
3.7.1	Hidrólises de amostras proteicas.....	76
3.7.1.1	Hidrólise ácida.....	77
3.7.1.2	Oxidação com ácido perfórmico e posterior hidrólise ácida.....	77
3.7.1.3	Hidrólise alcalina.....	77
3.7.2	Implantação da análise de aminoácidos resistentes à hidrólise ácida.....	78
3.7.2.1	Preparo do tampão acetato, fase móvel A, para a análise de aminoácidos.....	78
3.7.3	Implantação do método de análise de aminoácidos sulfurados.....	79
3.7.3.1	Implantação de método de análise rápida para sulfurados.....	79
3.7.4	Implantação do método de análise de triptofano.....	80
3.8	Utilização do derivatizante AQC para determinação de álcoois.....	80
3.9	Utilização do derivatizante AQC para determinação de hidroxiprolina (colágeno)..	81
3.10	Implantação e melhoria de método de análise de metilxantinas.....	81
3.11	Análise de produtos de degradação do ATP (hipoxantina).....	81
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.1	Obtenção de padrões analíticos por cromatografia líquida em escala analítica...	82
4.1.1	Purificação de carotenoides minoritários.....	82
4.1.1.1	Obtenção de zeinoxantina e β -criptoxantina de cajá manga.....	82
4.1.1.2	Obtenção de isômero <i>cis</i> de licopeno de Melão-de-São-Caetano.....	85
4.1.1.3	Obtenção de isômeros <i>cis</i> de β -caroteno de alface	87
4.1.2	Purificação de carotenoides majoritários.....	88
4.1.2.1	Obtenção de alfa e β -caroteno de cenoura.....	88
4.1.3	Novas fontes vegetais de carotenoides.....	90
4.1.3.1	Caferana (<i>Bunchosia armeniaca</i>) como fonte de licopeno.....	90
4.1.3.2	<i>Eugenia puniceifolia</i> como fonte de licopeno.....	92
4.1.3.3	Melão-de-São-Caetano (<i>Mormodica charantia</i> L.) como fonte de zeaxantina.....	93
4.1.3.4	<i>Clusia fluminensis</i> e <i>Clusia major</i> como fontes de zeaxantina.....	95
4.1.3.5	Comparação entre teores de carotenoides das fontes avaliadas e as de referência.....	96
4.1.4	Melhoria do método analítico de bixina e norbixina.....	98
4.1.5	Implantação do método de análise de ácidos fenólicos.....	99
4.1.6	Purificação de isoflavonas.....	102
4.1.6.1	Aplicação do método para detecção de isoflavonas em carnes.....	105
4.1.6.2	Melhoria do método de análise de isoflavonas.....	106
4.1.7	Purificação de retinol.....	108
4.2	Análise de aminoácidos e utilização do método de derivatização com AQC.....	109
4.2.1	Melhoria da separação dos derivados AQC de aminoácidos.....	109
4.2.1.1	Separação de derivados de aminoácidos em coluna com partícula de 2,4 μ m.....	110
4.2.1.2	Preparo do tampão acetato para a análise de aminoácidos.....	111
4.2.2	Análise de aminoácidos sulfurados.....	111
4.2.2.1	Implantação de método de análise rápida para sulfurados.....	114
4.2.3	Análise de triptofano.....	115
4.2.4	Utilização do derivatizante AQC para determinação de álcoois.....	117

4.2.5	Método de determinação de colágeno (hidroxiprolina) em carnes.....	118
4.3	Método de análise de xantinas.....	121
4.3.1	Análise rápida de cafeína, teofilina e teobromina.....	122
4.3.2	Análise de produtos de degradação do ATP.....	124
5	CONCLUSÕES.....	125
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é essencialmente uma técnica de separação de substâncias, por muito tempo após a sua criação sofreu com o descrédito, seja pelo preconceito devido à simplicidade de sua fundamentação, ou ainda pela não aceitação, e até oposição, por parte de renomados cientistas. Após longos anos de estagnação, a cromatografia ressurgiu e apresentou um crescimento exponencial de sua aplicação, fato já prenunciado pelo seu inventor na ocasião da criação, e que lhe fez chegar a ser atualmente a principal técnica analítica aplicada a inúmeras áreas da ciência.

A instrumentação desenvolvida para a cromatografia líquida, inicialmente concebida pelos próprios usuários da técnica, cresceu também de maneira muito rápida. Atualmente existem inúmeros fabricantes de sistemas cromatográficos que estão espalhados por todo o mundo. A competição comercial mantém a evolução técnica, o que levou as empresas ao desenvolvimento de sistemas que atualmente trabalham em escala de ultra-eficiência e até nano-cromatografia. Do mesmo modo, a evolução e a criação de novos sistemas de detecção multiplicaram ainda mais a gama de aplicações analíticas.

No entanto, esta assombrosa evolução dos equipamentos desenvolvidos e a multiplicação de metodologias e aplicações nos trazem à necessidade do resgate da cromatografia como técnica de separação e purificação de substâncias, e não apenas a sua utilização como técnica analítica qualitativa e quantitativa.

Em relação às substâncias estudadas, muitas ainda são desconhecidas e não estão comercialmente disponíveis, bem como podem ser instáveis e de difícil obtenção. Isto nos leva a mais uma dificuldade analítica, a obtenção de padrões confiáveis. O resgate desta característica da cromatografia líquida vem trazer uma solução para esta questão, o preparo dos padrões analíticos pelos próprios analistas.

Assim como em inúmeras áreas da atividade humana, na ciência e tecnologia de alimentos a cromatografia líquida se faz imprescindível. As mais antigas questões, como o sequenciamento de proteínas e enzimas, a análise de compostos bioativos, o controle de qualidade e a detecção de adulterações e fraudes, tem na cromatografia líquida a sua maior e mais versátil ferramenta.

Uma nova demanda há pouco tempo chegou à área analítica, a busca por metodologias mais rápidas e sensíveis, ao mesmo tempo em que menos agressivas ao ambiente. O foco dos métodos analíticos passou a contemplar os meios de obtenção dos resultados, surgem conceitos como o da química verde. Esta nova questão deve sempre ser debatida e estar na mente dos químicos analíticos, porém, ainda existe uma resistência natural em se aceitar novas metodologias analíticas. Prova disto é a constatação da demora nas atualizações das metodologias oficiais, que continuam a referenciar métodos obsoletos, menos eficientes e baseados em princípios há muito superados.

Este trabalho condensa parte do empenho de um laboratório de cromatografia e sua equipe, o Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em atender as demandas de vários projetos de pesquisa, bem como de seus próprios projetos. Ao atender tais demandas, dentro das condições estabelecidas pela nossa estrutura física,

equipamentos e pessoal, muitas parcerias foram estabelecidas, métodos foram desenvolvidos, melhorados e aplicados.

O objetivo geral deste trabalho é:

- Melhorar e implantar metodologias analíticas via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para a análise de substâncias de grande interesse para a ciência e a indústria de alimentos.

Os objetivos específicos são:

- Através da cromatografia líquida de alta eficiência, obter padrões analíticos com pureza superior a 90% de carotenoides, flavonoides e retinol.
- Melhorar os métodos analíticos de determinação de aminoácidos, isoflavonas e carotenoides, visando melhor resolução, redução no tempo de análise, gasto menor de solventes e geração de menor volume de resíduos. Para isso, serão avaliadas colunas com tamanho de partículas inferiores a 3 μ m e sua aplicabilidade em sistemas cromatográficos de alta eficiência.
- Avaliar a aplicação do método de derivatização pré-coluna para determinação de aminoácidos na determinação de outros compostos de interesse, como álcoois e colágeno, indiretamente através da análise do aminoácido hidroxiprolina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da cromatografia líquida

2.1.1 Primeiros relatos de fenômenos relacionados à cromatografia

É senso comum entre os historiadores da ciência, creditar o mérito da invenção da cromatografia ao botânico russo Tswett, tendo como marco um relatório publicado em 1903. No entanto, são muitos os registros de fenômenos relacionados à cromatografia anteriores à Tswett. Provavelmente, a primeira observação de utilização destes fenômenos seja um relato do historiador romano Caio Plínio Segundo (23-79) no ano de 77 da nossa era. Conhecido como Plínio, o Velho, era um militar romano naturalista, que devido a sua dedicação ao entendimento dos fenômenos naturais, acabou falecendo quando atingido pela emissão de gases tóxicos ao tentar observar a erupção do vulcão Vesúvio em Pompéia no ano 79.

Entre os anos de 77 e 79, Plínio publicou em latim uma grande obra chamada História Natural (“*Naturalis Historia*”), trata-se de uma grande enciclopédia que na forma atual consiste em trinta e sete livros. No capítulo 26 do livro de número 34, Plínio descreve um método para verificar a autenticidade de *verdigris*, um sal fabricado através da reação de cobre metálico com ácido acético que desde a antiguidade tem sido usado como fungicida e pigmento verde. Na época, uma fraude comum era a adição de pó de mármore verde ao *verdigris* para aumentar o seu rendimento. Plínio descreve então um método onde aplicava o produto em folhas de papiro embebidas com um extrato vegetal, no caso de autenticidade, o papiro tornava-se imediatamente negro (PERSEUS-DIGITAL-LIBRARY, 2012).

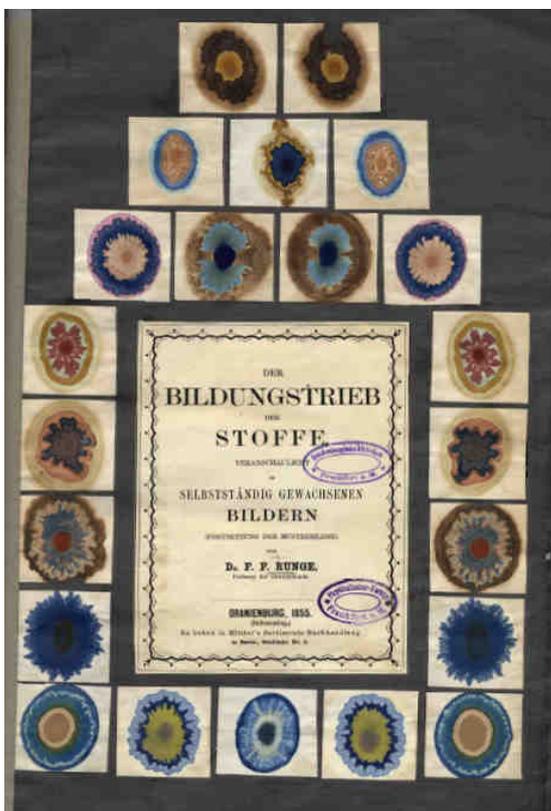
Outro relato de um fenômeno cromatográfico aparece 1700 anos depois de Plínio, o autor é Jöns Jacob Berzelius (1779–1848). Berzelius é mais conhecido como um dos fundadores da química moderna, descobriu, isolou e determinou o peso atômico de vários elementos químicos. Berzelius formou-se em medicina em 1800, quando publicou um estudo sobre a composição salina das águas do *spa* Medevi na Suécia, famoso por suas águas e lamas medicinais e que se encontra em funcionamento até os dias de hoje. Berzelius seguiu sua carreira científica com o estudo e preparo de águas minerais artificiais, muito utilizadas na época para tratamento de inúmeras enfermidades (TECHNOLOGY, 2004). Em seus estudos com água, Berzelius observa e descreve o fenômeno da desmineralização da água salgada por meio de filtração através de areia.

Em 1844, o físico e neurofisiologista italiano Carlo Matteucci (1811-1868) foi convidado pelo governo da Toscana para ministrar um curso sobre fenômenos físicos dos seres vivos na Universidade de Pisa. Em 1847, Matteucci publica o livro “palestras sobre os fenômenos físicos de seres vivos”. Em suas observações empíricas, Matteucci reproduz o experimento de Berzelius, onde água salgada é transformada em “fresca” por meio de filtração. Uma solução salina foi filtrada através de um tubo de 8 metros contendo areia, a água que saía do tubo era menos densa que a inserida no topo, no entanto, a diferença de densidade não era mantida, e, depois de certo tempo, a solução de saída tornava-se tão densa quanto à de entrada (MATTEUCCI, 1847). Matteucci buscava explicação para a existência de fontes de água doce a partir de água do mar percolada através do solo. Na mesma publicação, Matteucci ainda relata o interessante fenômeno que ocorre quando gotas de chocolate ou tinta caem sobre a roupa ou papel de filtro, formando um ponto central escuro circundado por uma zona de líquido claro colorido. O mesmo efeito foi observado quando o sangue extravasa o tecido celular subcutâneo e o plasma se estende para as margens separando-se do material colorido (MATTEUCCI, 1847).

2.1.2 As imagens auto formadas de Runge

Encontra-se na biblioteca Beinecke de livros e manuscritos raros da Universidade de Yale, na cidade norte americana New Haven, um livro de grande interesse para a história da cromatografia, que provavelmente seja mais consultado por curiosos e pesquisadores da área artística. Trata-se de um livro de 43 por 26,5 centímetros composto por colagens de figuras multicoloridas, incrivelmente bem preservadas, distribuídas em 32 páginas de cartolina preta. Cada figura tem aproximadamente 12 por 14 centímetros e contém um cartão com explicações de como foram preparadas. O livro foi publicado em alemão em 1866 e sua capa (Figura 1B) traz 22 figuras coladas ao redor do título: “*Das Od als Bildungstrieb der Stoffe: Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern*”. A capa ainda apresenta o autor, F. F. Runge, e o valor pelo qual era vendido, quatro Thaler (moeda de prata usada na Europa na época) (RUNGE, 1866a; RUNGE, 1866b; BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

A



B

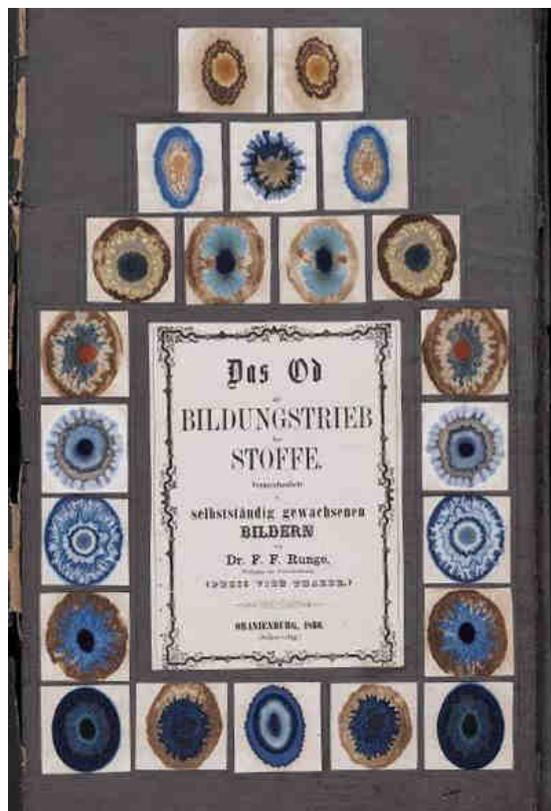


Figura 1 – Capas dos livros: **A**-“ Der Bildungstrieb der Stoffe veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern: (Fortsetzung der Musterbilder)” e **B**-“*Das Od als Bildungstrieb der Stoffe : Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern*” de F. F. Runge.

Fonte: **A** – RUNGE, 1855, capa. **B** – RUNGE, 1866a, capa.

2.1.2.1 Biografia de Friedlieb Ferdinand Runge

Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867) nasceu em Billwerder, subúrbio de Hamburgo na Alemanha. Aos 16 anos se mudou para Lübeck para dar início ao aprendizado de farmácia junto a seu tio. Com 22 anos inscreve-se para estudar medicina na Universidade de Berlim. Dois anos depois se mudou para a Universidade de Gottingen e após um ano para a Universidade de Jena, onde concluiu seu curso em 1919. No entanto, Runge nunca praticou medicina, nos últimos anos do curso se interessou pela química, em especial ao estudo de substâncias venenosas presentes em plantas. Seu mestrado foi com o estudo da atropina, constituinte da planta belladona (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

Em 1819, Runge muda-se para Berlin onde assume a docência de química na Universidade. Dentre suas publicações estão estudos com substâncias ativas de plantas, e a ele é creditado o isolamento da substância estimulante do café, a cafeína. Em 1922, Runge obtém o título de Doutor em Química pela Universidade de Berlim com estudo sobre o corante índigo.

Em 1823 Runge muda-se para Breslau, atualmente Polônia, e associa-se como docente na Universidade local. Após alguns meses ele embarca em uma viagem de mais de dois anos para visitar laboratórios e estudar plantas industriais e instalações pela Suíça, França, Holanda e Inglaterra acompanhando o filho de Carl Milde, um rico empresário de Breslau. Em 1826, Runge retorna a Breslau e se junta à fábrica têxtil de Milde (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

Paralelamente ao trabalho com corantes têxteis, Runge continua a lecionar química técnica na Universidade e dedica-se a escrever livros de química. Sua intenção era popularizar a química, ensinando a todos, prova de seu sucesso são as tiragens de até 15.000 cópias de seus livros, número enorme para a época (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

Em 1832, Runge deixa Breslau para trabalhar na fábrica química do Dr. Hempel em Oranienburg como diretor técnico, onde permaneceu associado por 20 anos. A fábrica era grande exportadora de matéria prima, em especial para a indústria de corantes, chegando a possuir 150 funcionários (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

Runge aposenta-se da fábrica de Hempel em 1852, mas continua contribuindo como consultor. Neste período é que se dedica a escrever seus livros e a produção de vinho, outra paixão (Figura 2). Runge falece em março de 1867 (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).



Figura 2 – F. F. Runge no final de sua vida.

Fonte: BUSSEMAS, 2004, p. 264.

2.1.2.2 Os livros de Runge

O interesse de Runge por cores está relacionado à sua atividade na fábrica têxtil em Breslau e posteriormente na fábrica de Hempel. Runge reuniu todo seu conhecimento em tingimento de algodão em uma série de livros em 3 volumes (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

- A química da coloração I – Discute o tingimento do algodão - 1834
- A química da coloração II – Discute a impressão de têxteis – 1842
- A química da coloração III – Discute a preparação de corantes - 1850

Em todos os exemplares, Runge apresenta como ilustrações pequenos pedaços de tecidos para demonstrar os padrões de cor. No terceiro volume (Figura 3), Runge menciona e demonstra que a utilização de um pequeno pedaço de papel de filtro é muito útil para testar soluções de tingimento (BUSSEMAS e ETTRE, 2004):

“...devido à sua força de capilaridade, separa os componentes de uma gota colocada no centro... cria uma imagem com uma parte central escura e áreas ou anéis coloridos ou mesmo incolores.”

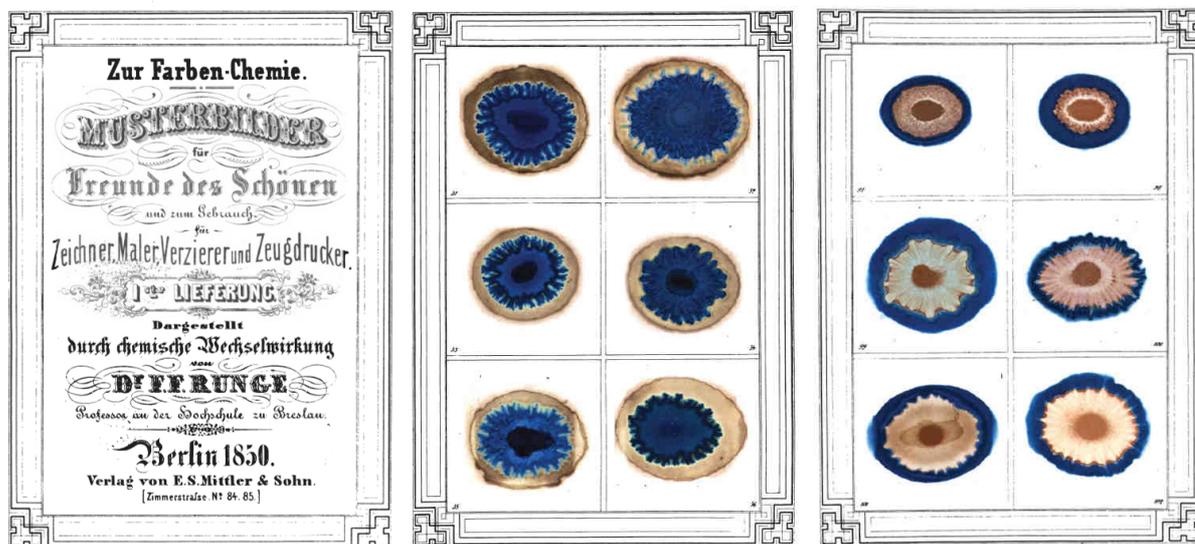


Figura 3 – Capa e figuras 31 a 36 e 91 a 102 do livro: A química da coloração III de F. F. Runge de 1850.

Fonte: RUNGE, 1850.

Runge ficou fascinado com a capacidade do teste em papel de filtro em separar os pigmentos de tintas, em especial as de cor escura que eram difíceis de identificar em solução (BUSSEMAS e ETTRE, 2004).

Em 1855, Runge publica um livro inteiramente dedicado aos seus discos de papel de filtro com os desenhos formados por pigmentos (Figura 1A página 4). Abaixo de cada figura está afixado um cartão com a composição da mistura de pigmentos utilizados e instruções para reprodução (Figura 4). A Figura 5 da página 8 traz as principais figuras obtidas por Runge que constam nesta publicação.



Figura 4 – Cartão com instruções para reprodução do experimento com pigmentos.

Fonte: RUNGE, 1855, p. 26.



Figura 5 – Figuras formadas pela aplicação de misturas de pigmentos em papel de filtro, produzidas por Runge.

Fonte: RUNGE, 1855.¹

¹ Mosaico de figuras digitalizadas e montadas pelo autor a partir dos papéis de filtro colados no livro de 1855 de F. F. RUNGE.

Em 1866, apenas um ano antes de sua morte, Runge publica seu último livro com mais discos de papel filtro (Figuras 6 e 1B página 4). Aparentemente Runge dedicou seus últimos anos de vida à produção destas figuras, que são muitas vezes citadas como forma de expressão artística.

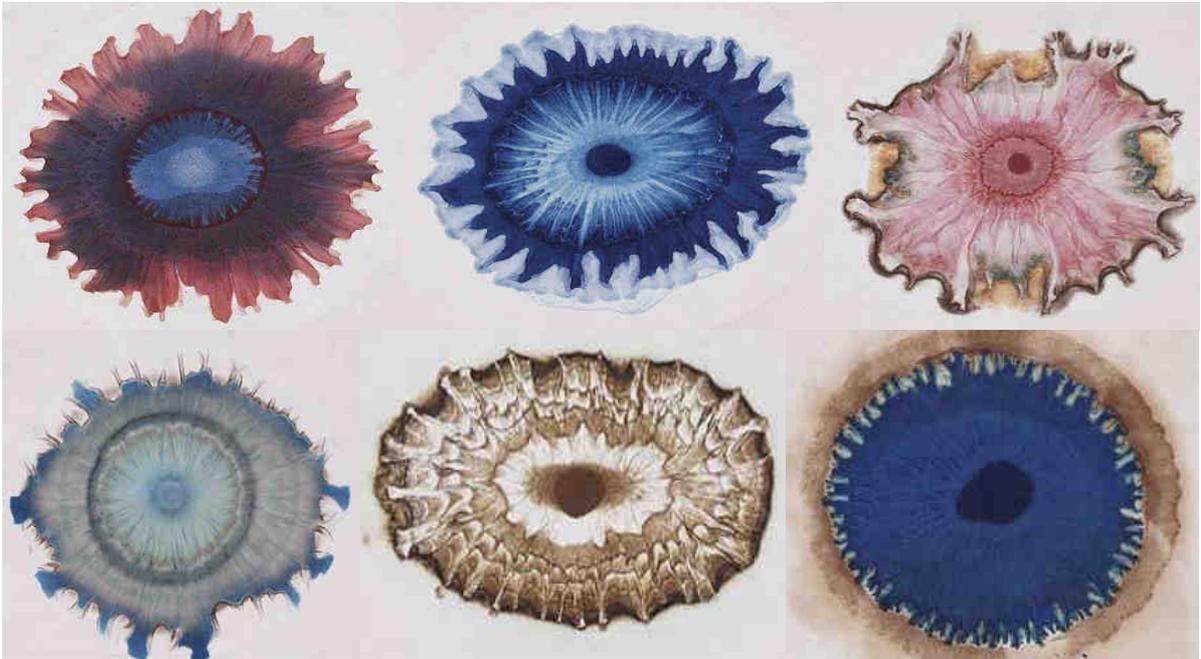


Figura 6 – Mais separações de pigmentos em papel filtro
Fonte: RUNGE, 1866.²

Runge demonstra neste, e nos demais livros, uma preocupação em provar que seus experimentos são reprodutíveis, para isso em geral ele apresenta em uma mesma página duas figuras do mesmo experimento (Figura 7 página 10).

² Mosaico de figuras digitalizadas e montadas pelo autor a partir dos papéis de filtro colados no livro de 1866 de F. F. RUNGE.

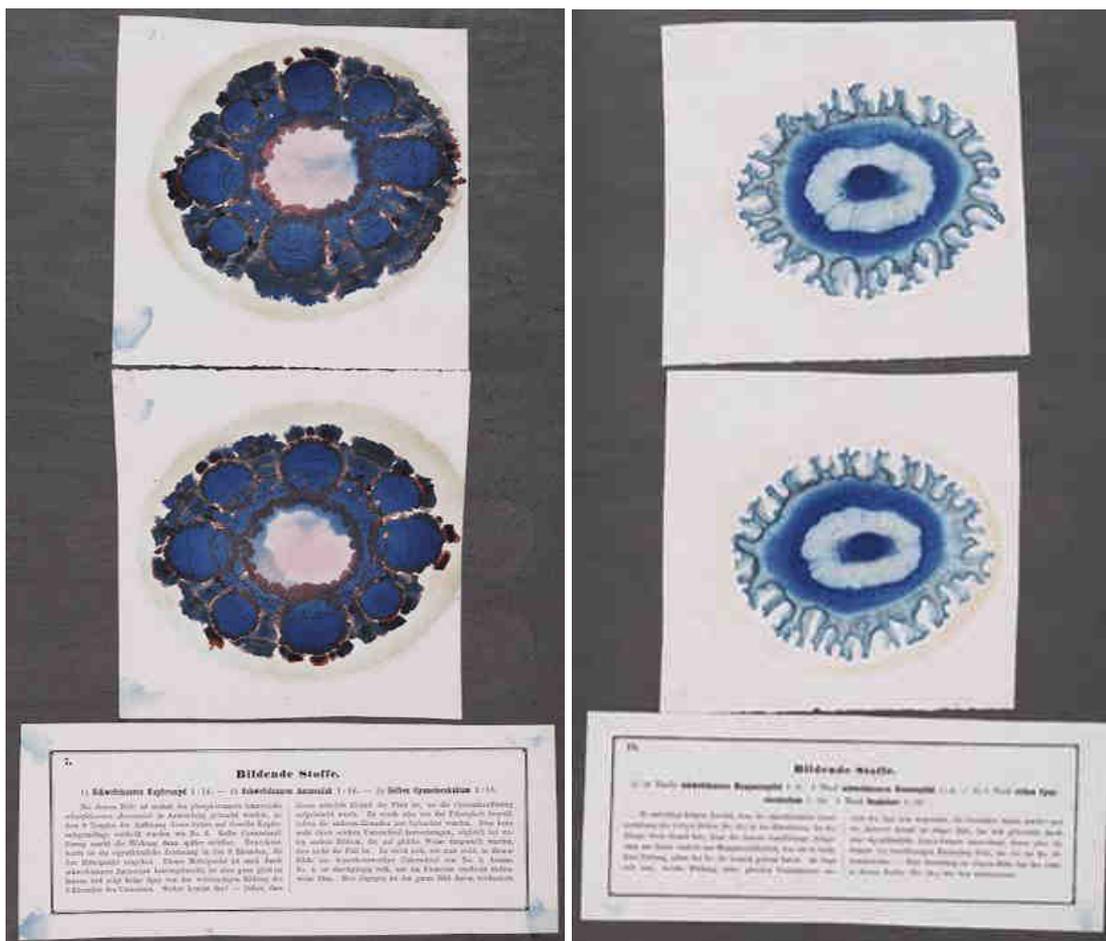


Figura 7 – Experimentos demonstrando a reprodutibilidade dos testes com misturas de pigmentos em papel de filtro.

Fonte: RUNGE, 1866.³

2.1.3 A contribuição de Schönbein

Christian Friedrich Schönbein (1799-1868), professor de química da Universidade da Basileia na Suíça, é reconhecido principalmente pela descoberta do ozônio e pela invenção da nitrocelulose. Fato no mínimo curioso, sem no entanto ter relação com a cromatografia, foi a descoberta acidental do explosivo nitrocelulose em 1845. Ao realizar experimentos na cozinha de sua casa, Schönbein usou um avental de sua esposa para limpar respingos de uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico. Ao colocar o avental para secar sobre o fogão, este se incendiou e quase que instantaneamente desapareceu.

O trabalho que o levou a descoberta do ozônio é o que o relaciona com a história da cromatografia. É de 1839 o primeiro relato de uma substância responsável pelo odor característico que aparecia no eletrodo positivo quando se realizava a eletrólise da água, mesmo odor produzido por um arco elétrico entre dois eletrodos. Schönbein sugere que tal odor característico seja oriundo de uma substância química, e dá a ela o nome de ozônio (RUBIN, 2001).

Em carta escrita a Berzelius em 14 de abril de 1844, Schönbein menciona a utilização de tiras de papel embebidas em solução de amido contendo iodeto de potássio para a identificação qualitativa do ozônio. Dentre os demais testes para detectar este gás, o teste com as tiras de papel se mostrou o mais sensível e conveniente, indicando a presença do ozônio

³ Digitalização das páginas 7 e 16 do livro de 1866 de F. F. RUNGE.

mesmo quando seu odor característico não era perceptível. A presença do ozônio decompõe o iodeto de potássio gerando iodo livre, este então reage com o amido deixando o papel azul (KAHLBAUM, 1900).

Schönbein cita, ao fazer experimentos com tiras de papel, que ao mergulhar uma ponta da tira em solução aquosa, o solvente e as substâncias dissolvidas sobem pelo papel com velocidades diferentes. Tais observações levaram um de seus alunos a dedicar praticamente toda sua carreira científica a realizar separações de pigmentos em tiras de papel, o seu nome era Friedrich Goppelsroeder (ETTRE, 2001).

2.1.4 A contribuição de Goppelsroeder

Friedrich Goppelsroeder (1837-1919) publicou em 1901 um livro com os resultados da técnica que chamou de Análise Capilar (*Capillaranalyse*), em referência ao fenômeno de capilaridade, o qual julgava ser o responsável pela separação dos componentes de uma mistura em tiras de papel. Na verdade, o livro e suas demais publicações no assunto não trazem muita discussão acerca do fenômeno, e sim um relato detalhado de uma quantidade elevada de experimentos individuais (GOPPELSROEDER, 1901; ETTRE, 2001).

Os experimentos de Goppelsroeder consistiam em mergulhar uma das pontas de uma tira comprida de papel na solução que desejava estudar (Figura 8), o papel permanecia durante todo o tempo imerso na solução. Este fato foi o que limitou os resultados obtidos por Goppelsroeder, pois desta maneira não ocorria a clara separação das substâncias presentes na amostra, as zonas acabavam se sobrepondo umas às outras (ETTRE, 2001). Se Goppelsroeder tivesse ao menos uma única vez aplicado uma quantidade finita de amostra ao papel, e então deixado a análise evoluir apenas com solvente puro, muito provavelmente hoje ele seria conhecido como o pai da cromatografia (NEWSELY, 1990).

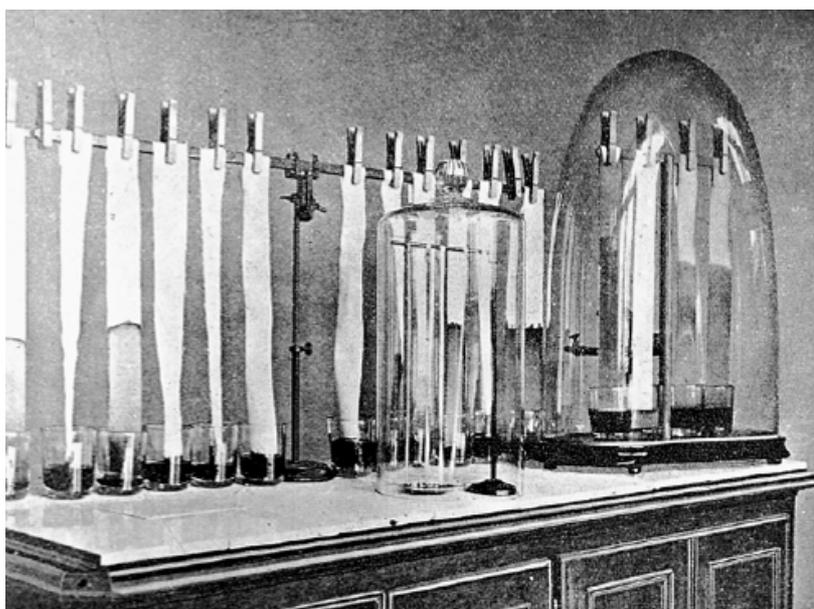


Figura 8 – Os experimentos de Goppelsroeder com tiras de papel.

Fonte: ETTRE, 2001, p. 411.

2.1.5 A invenção da cromatografia

2.1.5.1 Biografia de Mikhail Semenovich Tswett

Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919) (Figura 9), nasceu em Asti na Itália em 14 de maio de 1872. Filho de russos, seus pais estavam em férias a caminho do lago Maggiore, no norte da Itália, no entanto as condições de saúde de sua mãe grávida exigiram que parassem em Asti. Sua mãe falece pouco tempo após seu nascimento e seu pai muda-se para a Suíça. Tswett vive na Suíça por 24 anos, graduando-se em botânica na Universidade de Genebra e em 1896 recebe seu PhD (ETTRE, 2003; KRASNOVSKY, 2003).

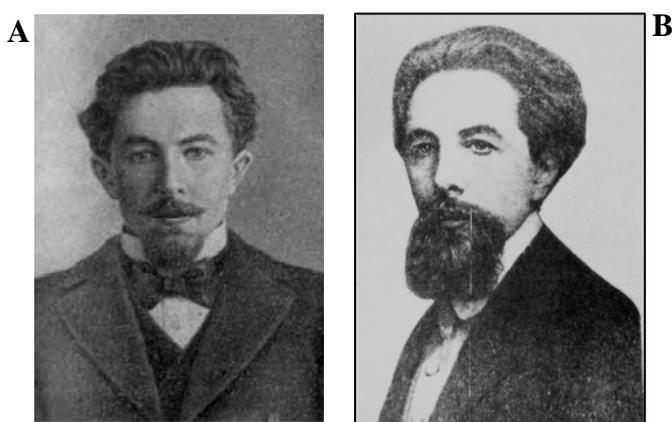


Figura 9 – Fotos de Mikhail Semenovich Tswett.
Fonte: A- BEREZKIN, 1989, p. 279. B- KRASNOVSKY, 2003, p. 392.

Em 1896, Tswett deixa a Suíça e após breve estada na Itália decide se repatriar à Rússia para se juntar a seu pai. Em 1897 começa a trabalhar no laboratório de biologia da Academia de Ciências de São Petersburgo, ao mesmo tempo se dedica à preparação de uma nova dissertação de mestrado, pois o sistema russo exigia mestrado feito na Rússia para uma colocação acadêmica júnior e doutorado russo para uma colocação acadêmica sênior. A maioria de seus experimentos foi conduzida no laboratório de fisiologia e anatomia de plantas da mesma instituição. Tswett enfrentou muitas dificuldades, pois estava longe de ser fluente em russo, sua língua nativa era o francês (BEREZKIN, 1989; ETTRE, 2003).

Em 1901 Tswett defende sua dissertação de mestrado na Universidade de Kazan, sob o título: “Um estudo físico químico do grão de clorofila. Experimentos e análises”. A qualificação foi considerada um sucesso. O título de mestre, no entanto, não lhe rendia qualquer benefício financeiro extra, e para poder financiar sua pesquisa Tswett lecionava em escolas secundárias (BEREZKIN, 1989).

Durante palestra ministrada em março de 1903, Tswett fala sobre uma nova categoria de fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas. Seu relato causa vívida discussão dentre os presentes e no mesmo ano ele publica um relatório. É então dado a 1903 o crédito do ano do nascimento da cromatografia. Em 1906 Tswett publica dois artigos descrevendo a análise cromatográfica e sua aplicação no estudo da química da clorofila (BEREZKIN, 1989).

Em 1908, Tswett foi aceito na equipe do Instituto Politécnico de Varsóvia para estudar botânica. Em 1910 defende com elogios sua tese de doutorado na Universidade de Varsóvia.

Tswett falece em 26 de junho de 1919, aos 47 anos, devido a uma doença cardíaca. Seu túmulo (Figura 10) encontra-se em um convento na cidade russa de Voronezh (BEREZKIN, 1989; KRASNOVSKY, 2003).



Figura 10 – Lápide de Tswett na cidade russa de Voronezh, onde se lê a inscrição: **"Ele inventou a cromatografia, separando moléculas mas unindo pessoas."**

Fonte: KRASNOVSKY, 2003, p. 393.

2.1.5.2 Relatório preliminar de Tswett publicado em 1903

O relatório publicado em 1903 por Tswett é considerado o marco da invenção da cromatografia, trata do novo fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas. O foco dos estudos de Tswett sempre foi a clorofila, lhe chamou a atenção e o levou a inúmeros experimentos o fato da insolubilidade da clorofila em alguns solventes orgânicos.

Tswett define a clorofila como um grupo de pigmentos solúvel em álcool que dá aos vegetais sua coloração característica. Ainda em seu relatório, Tswett afirma que tal grupo de pigmentos contém não menos do que cinco substâncias divididas em duas categorias, as clorofilas e as xantofilas. Na época já havia relatos de separação destas substâncias com a utilização de sistemas binários de solventes.

Ao realizar testes de solubilidade de seus extratos de plantas, Tswett observou que ao secar sob vácuo um extrato de clorofila em papel de filtro, este se tornava verde e era possível extrair seletivamente do papel de filtro os carotenos e a clorofila. Observa ainda que a clorofila é facilmente levada de uma forma solúvel para uma insolúvel sem afetar as suas estruturas químicas. Tswett conclui então que os pigmentos e a celulose do papel de filtro estavam envolvidos em um fenômeno de adsorção, e que estudos sistemáticos desta questão trariam luz ao fenômeno de adsorção e permitiriam a elaboração de uma nova técnica de separação física de substâncias (TSWETT, 1903).

Vislumbrando as potencialidades de suas afirmações e descobertas, Tswett efetua extensivos experimentos, chegando a listar mais de 100 substâncias estudadas como adsorventes, dentre elas:

- Enxofre, inulina, magnésio, zinco e chumbo;
- Óxidos de magnésio, ferro e prata;
- Hidróxidos de alumínio e potássio;

- Ácidos bórico, oxálico e tartárico;
- Sais de ácido clorídrico, perclórico e sulfúrico;
- Aldeídos e amidas;
- Hidrocarbonetos e alcaloides.

Dentre as variadas substâncias e classes químicas, Tswett chegou a testar materiais como lã de vidro, solo, carvão e pó de osso e sangue.

Os testes com os adsorventes eram conduzidos de três maneiras diferentes e chamam muita atenção, pois muitos dos procedimentos são utilizados até os dias de hoje:

- 1- O adsorvente escolhido era macerado em um pó fino e então colocado em um tubo fino de vidro com uma tampa de papel de filtro para reter o pó. O pó então era densamente acamado no tubo com o auxílio de um bastão de vidro. Uma porção de solvente era então passada através do pó para remover o ar e por fim a solução com o extrato de clorofila era vertida diretamente no topo da coluna formada. A filtração era então realizada com a utilização de uma pequena pressão negativa ou positiva.
- 2- O extrato de clorofila era colocado em um tubo de ensaio e uma porção do adsorvente era adicionada. Após agitação, o tubo era centrifugado e o adsorvente acumulava no fundo do tubo com os pigmentos.
- 3- No caso de adsorventes higroscópicos, a substância era adicionada a um graal contendo uma porção de solvente e então a mistura era macerada.

Tswett conclui que todas as substâncias testadas eram capazes de adsorver parte ou a totalidade dos pigmentos da clorofila. No texto, ele prossegue com os resultados de suas investigações e calcula a área superficial para um dos adsorventes utilizados, a inulina. Considerando partículas uniformes de aproximadamente $2\mu\text{m}$ de diâmetro, Tswett chega ao valor de $2,22\text{m}^2$ por grama de inulina. É indício da compreensão da relevância do tamanho da partícula no fenômeno da adsorção.

Tswett descreve detalhadamente o fenômeno de adsorção dos pigmentos com os testes com inulina, relatando que ao agitar o extrato na presença do adsorvente, parte dos pigmentos é imediatamente adsorvida e o sólido precipita no fundo do frasco com coloração verde. Ao mesmo tempo, o sobrenadante gradualmente clarifica e torna-se amarelo. Se quantidades suficientes de adsorvente são adicionadas, a solução final apresenta apenas a presença de carotenos, o que foi confirmado espectroscopicamente (TSWETT, 1903).

Diferentes solventes foram testados para liberar os pigmentos adsorvidos na inulina, e Tswett conclui que apenas com álcool todos os pigmentos eram solubilizados do adsorvente. Avaliações espectroscópicas demonstraram que as soluções assim obtidas continham os pigmentos em sua forma original, ou seja, o fenômeno de adsorção e dessorção não alteravam a estrutura dos pigmentos. Desta maneira, Tswett compreende a reversibilidade do processo de adsorção, afirmando que é possível, após a dessorção dos pigmentos, voltar a adsorvê-los com nova porção de inulina ou outro adsorvente.

Tswett descreve que o fenômeno de adsorção é mais claramente demonstrado quando o extrato vegetal é filtrado através do adsorvente. Observa que inicialmente o líquido que passa através do adsorvente apresenta-se incolor, em seguida torna-se amarelo enquanto uma camada verde intensa forma-se no topo da coluna de inulina.

“Logo uma fronteira amarela aparece na borda inferior do anel. Durante passagem subsequente de solvente puro através da coluna de inulina, tanto o anéis verdes e amarelas são consideravelmente ampliados e espalhados até certo limite. Isto prova que aqui (assim como

em outros processos já conhecidos de adsorção) a quantidade de substância adsorvida depende da sua concentração” (TSWETT, 1903).

Tswett ainda nomeia o processo que observa como filtração, descreve que se o comprimento da coluna é suficientemente longo para reter todas as substâncias, o anel amarelo formado se move através do adsorvente. Esse movimento pode atingir a base da coluna de modo que a solução que flui torna-se amarela novamente.

Com os experimentos usando outros adsorventes, Tswett consegue diferenciar a adsorção, fenômeno físico, de reações químicas dos pigmentos, como oxidação e outras reações que alteravam os resultados das avaliações espectroscópicas. Tswett cita adsorventes ácidos e sais básicos e ácidos como agentes de alterações químicas nos pigmentos, podendo em alguns casos levar a total oxidação dos pigmentos.

Tswett chama a atenção ainda para a especial capacidade de adsorção de alguns materiais, como carvão e carvão de osso. Os pigmentos adsorvidos por esses materiais não podiam ser extraídos sequer com a utilização de álcool puro, o que era extremamente eficaz para os demais adsorventes. Tswett sugere que esta eficiência de adsorção esteja relacionada com a presença de grande quantidade de poros dessas substâncias, e compara ainda esta capacidade com a de materiais finamente moídos.

Como conclusão de seu exaustivo trabalho, Tswett percebe a importância analítica do mecanismo que acaba de descrever:

Com base no que precede, um novo método de separação física de diferentes substâncias em meios orgânicos pode ser proposto. O princípio deste método baseia-se na propriedade de substâncias dissolvidas sofrerem processo de adsorção em materiais sólidos de origem mineral e orgânica. O montante da substância encontrada no composto de adsorção depende do grau de moagem, bem como da sua natureza, da natureza da substância dissolvida, e da natureza do solvente. Todas estas diferenças podem ser utilizadas para a separação da substância por meio de sua precipitação fracionada de adsorção [...] Sem qualquer dúvida, uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de adsorção levaria à perfeição de sua aplicação analítica.

Fonte: TSWETT, 1903, p. 285.

2.1.5.3 As publicações de 1906

Tswett submete em 1906 dois artigos à comunidade científica, pois sua publicação de 1903, em russo, era apenas um relatório e permanecia desconhecida até mesmo por colegas próximos. Ele submete seus manuscritos para o jornal da Sociedade Alemã de Botânica, periódico Europeu líder no assunto na época. Em suas publicações, Tswett descreve em detalhes o método cromatográfico para a separação dos pigmentos de plantas. O segundo artigo contém a mais famosa declaração de Tswett (ETTRE, 2003):

Como raios de luz no espectro, os diferentes componentes de uma mistura de pigmentos, obedecendo a uma lei, são resolvidos na coluna de carbonato de cálcio e podem então ser qualitativa e quantitativamente determinados. Eu chamo esta preparação de cromatograma, e o método correspondente de método cromatográfico.

Fonte: ETTRE, 2003, p. 4.

A palavra cromatografia é composta por duas raízes gregas, *chroma* que significa cor e *graphein* que significa escrever, podendo então o termo ser traduzido como “*escrita das cores*”. Tswett provavelmente estava referindo-se a visualização dos anéis multicoloridos e separados na coluna cromatográfica. No entanto, existe outra interpretação para o termo:

Tswett em russo escreve-se **ТВЕТ**, foneticamente lê-se *tsvet*, e a tradução da palavra é “COR”. Desta maneira, cromatografia poderia ser traduzida também como: “**Escrita de Tswett**” (ETTRE, 2003; ABRAHAM, 2004).

O fato de Tswett não explicar a origem da definição do termo, apenas nomeando o método criado no artigo de 1906, deixa em aberto a discussão. Entretanto, a popularização do termo cromatografia leva a discussão apenas para um nível de registro histórico.

2.1.5.4 O aparato cromatográfico de Tswett

Nos dois artigos de 1906, Tswett ainda define e descreve com detalhes a cromatografia, a Figura 11 (a) apresenta o seu esquema do aparato construído para a cromatografia, capaz de correr até cinco colunas cromatográficas ao mesmo tempo. Neste sistema cromatográfico, Tswett montou um mecanismo com uma pera de borracha capaz de aumentar a pressão sobre a coluna para facilitar o fluxo do solvente através do adsorvente. Após a separação dos pigmentos, as colunas eram removidas do aparato e o adsorvente mecanicamente retirado da coluna, os anéis coloridos eram então fisicamente separados e as substâncias removidas do adsorvente por meio de extração com solvente. A figura apresenta ainda a opção de uma montagem para uma coluna maior (b), onde a base da coluna era submetida à baixa pressão com o auxílio de uma trompa d'água acoplada ao frasco. E, por fim, Tswett apresenta o primeiro cromatograma com a identificação das substâncias separadas (c) (ETTRE, 2003).

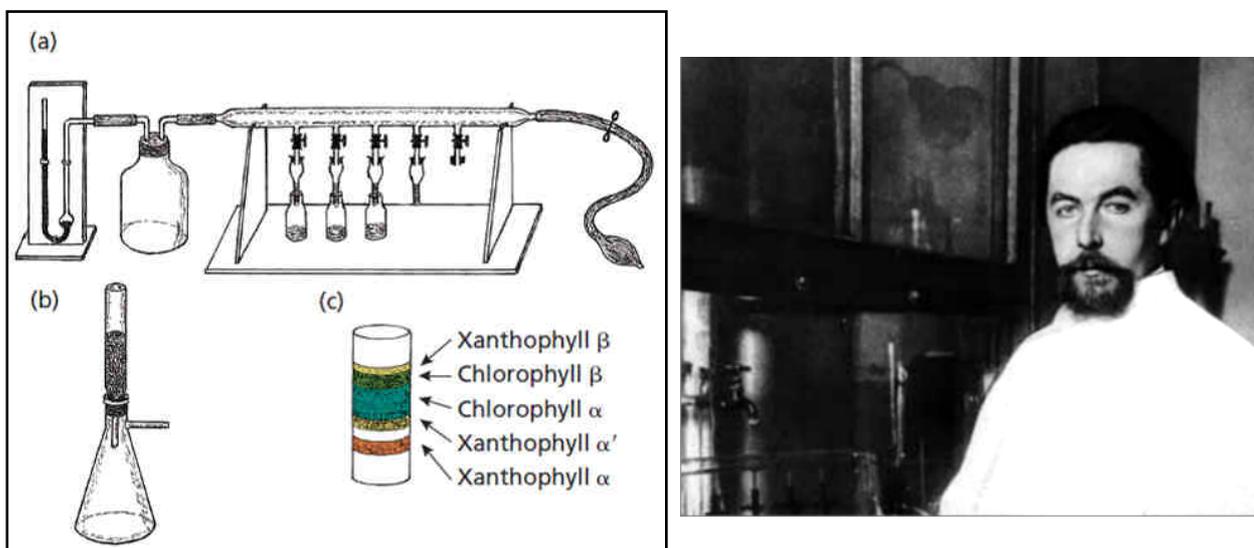


Figura 11 – A esquerda o esquema conforme apresentado por Tswett no artigo de 1906, a direita o autor ao lado de sua “Unidade Cromatográfica”.

Fonte: ETTRE, 2003, p. 2 e 4.

Na Figura 12, estão esquematicamente representadas as montagens de colunas feitas por Tswett, em A, uma das cinco colunas utilizadas no seu aparato de separação, a fase estacionária era acondicionada em camada de aproximadamente 4 centímetros de altura por 3 milímetros de diâmetro. Em B, uma coluna maior, 5 a 6 centímetros com 2 centímetros de diâmetro. Em C, coluna usada para cromatografia preparativa com 8 centímetros de altura e 3 de diâmetro.

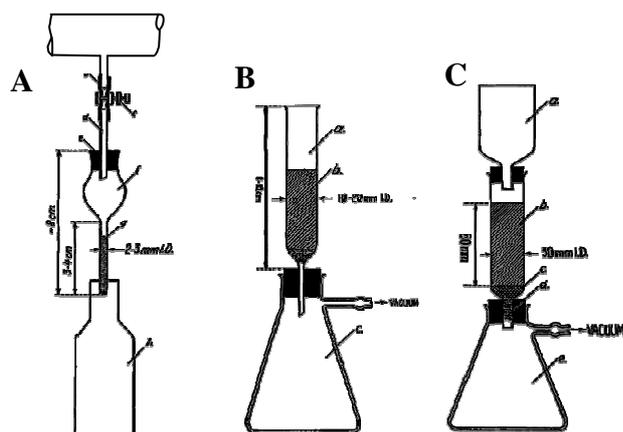


Figura 12 – Esquemas de montagens das colunas cromatográficas de Tswett.

Fonte: ETTRE, 1993, p. 331 e 332.

Em seus dois trabalhos acerca do método cromatográfico, Tswett discute sobre a correta seleção do solvente, sobre a possibilidade de melhorar a separação das substâncias através da adição de outro solvente durante a corrida cromatográfica, ou ainda pela substituição do solvente após a primeira separação. Tswett enfatiza que, apesar de todo seu trabalho ter sido realizado com a separação dos pigmentos de plantas, seu método poderia ser aplicado a outras substâncias, inclusive substâncias incolores (ETTRE, 2003).

As afirmações e registros de Tswett fazem referência ao que hoje chamamos de modo de eluição gradiente, onde a composição da fase móvel é alterada no decorrer da corrida cromatográfica, e ainda vislumbra as aplicações da técnica a toda sorte de substâncias químicas.

2.1.5.5 As publicações de 1910 e 1911

Em 1910 Tswett sumariza todo o conhecimento adquirido com seus experimentos em um livro publicado em russo sob o título: “Clorofilas no mundo animal e vegetal” (Figura 13 página 18). O livro lhe serve ainda para a obtenção do grau de Doutor. Em 1911 a publicação recebe o prêmio Akhmatov da Academia Imperial Russa de Ciências, um importante prêmio científico (ETTRE, 2003).



Figura 13 – Capa do livro “Clorofilas no mundo animal e vegetal”, publicado em russo em 1910 por Tswett.

Fonte: ETTRE, 1993, p. 332.

Seu livro ainda traz avanços na técnica cromatográfica descrita nos artigos anteriores, em novos experimentos com propósitos preparativos Tswett aumenta o tamanho de suas colunas cromatográficas para aproximadamente 8 centímetros de adsorvente com 3 centímetros de diâmetro. Tswett preferia parar a corrida cromatográfica quando observava a separação dos anéis na coluna, ao invés de coletar a substância isolada ao fluir da coluna dissolvida no solvente, mas esta possibilidade também é citada no livro (ETTRE, 2003).

Em 1911, Tswett publica sete artigos em jornais científicos Alemães e Franceses. Em uma destas publicações inclui uma discussão bastante detalhada de vários carotenoides, termo proposto por ele no artigo e que rapidamente foi incorporado ao vocabulário científico (ETTRE, 2003).

2.1.5.6 Considerações sobre os experimentos de Tswett

Os experimentos praticados por Tswett não foram fáceis de realizar, ele mostrou com seu trabalho científico que detinha grandes habilidades práticas e teóricas. Certamente o que conduziu Tswett ao sucesso com seus experimentos foi o seu grande interesse pela fisiologia vegetal, tinha fascinação pelo mistério da fotossíntese sendo a cromatografia apenas a ferramenta para desvendá-los. Prova dessas afirmações é a dificuldade de reprodução destes experimentos por outros pesquisadores, existem apenas dois registros da utilização com sucesso de suas técnicas na década de 1910 (MEYER, 1992).

Ainda nos dias atuais, com o avanço do conhecimento e uso de novos materiais, são muitas as dificuldades na reprodução dos experimentos de Tswett, exigindo profissionais experientes. A Figura 14 mostra uma foto de uma separação cromatográfica de um extrato vegetal em uma coluna de celite[®] e óxido de magnésio, reproduzindo o método de separação dos pigmentos vegetais desenvolvido por Tswett (PACHECO, 2009).

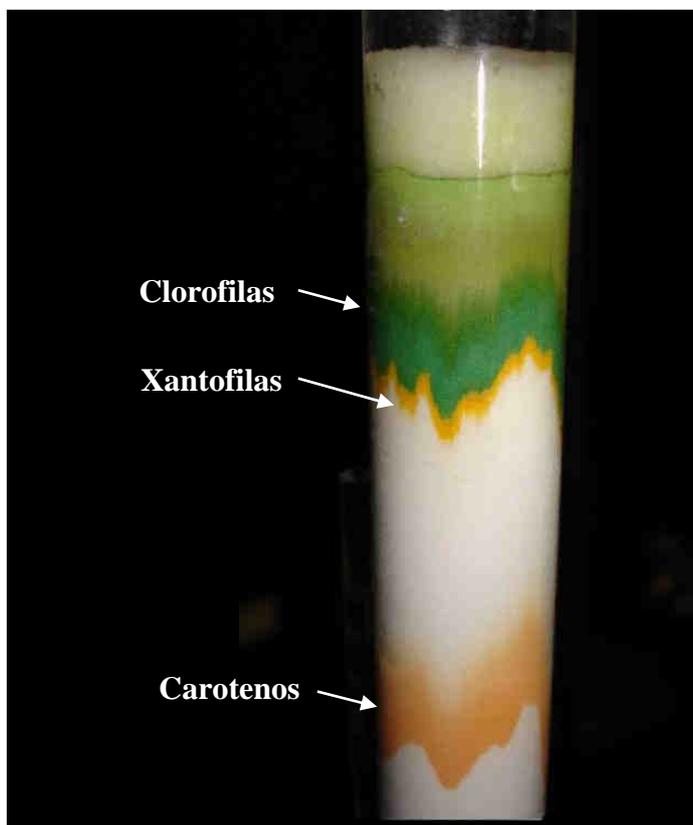


Figura 14 - Reprodução do experimento de Tswett, separação de um extrato de folhas vegetais por cromatografia em coluna aberta.

Fonte: PACHECO, 2009, p. 59.

Além da invenção da cromatografia, e com o uso dela, Tswett resolveu o problema do isolamento da clorofila e mostrou a existência de duas estruturas. Estas foram suas grandes contribuições ao grupo de pesquisadores russos que dedicaram suas carreiras ao estudo da fotossíntese (KRASNOVSKY, 2003).

Tswett se preocupava em deixar claras as diferenças de sua invenção com a técnica de análise capilar utilizada por Goppelsroeder (item 2.1.4 página 11). Apesar disto, muitos historiadores consideram Goppelsroeder o pai da cromatografia (ETTRE e SAKODYNSKII, 1993).

Tswett enfatizou que as substâncias cromatograficamente separadas são ao menos tão puras quanto às obtidas por meios tradicionais, como através de reações químicas, destilação e recristalização. De fato, ainda nos dias atuais, é usual o preparo de substâncias puras através da cromatografia, sejam para caracterizações químicas ou para utilização como padrões analíticos (ETTRE, 2003; PACHECO, 2009; PACHECO *et al.*, 2013).

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, da medicina e química, em especial a química de produtos naturais, além do monitoramento ambiental, seriam praticamente impossíveis sem a utilização das múltiplas técnicas cromatográficas (BEREZKIN, 2001).

Tswett foi indicado para receber o prêmio Nobel de 1918, no entanto não foi o vencedor. Questões adversas além do interesse da química clássica da época, que tinha foco em síntese, reações, determinações de pesos atômicos e físico-química, foram razões que levaram Fritz Haber a receber o prêmio, em função do desenvolvimento da síntese da amônia a partir dos gases hidrogênio e nitrogênio (ETTRE, 1996).

Em 1992, a revista Nature publicou artigo homenageando Tswett em comemoração ao centenário da invenção da cromatografia (JÖSSANG, 1992).

2.1.6 Utilização e evolução da cromatografia nos anos pós Tswett

Richard Willstätter, professor de química orgânica em Munique, era o grande competidor de Tswett no estudo da clorofila. Ele obteve a clorofila purificada através de cristalização fracionada, e esta forneceu uma única banda empregando o método de Tswett. Acreditando apenas nos métodos clássicos de purificação, Willstätter argumentou que a clorofila sofria degradação quando submetida ao processo de adsorção proposto por Tswett. Hoje em dia sabe-se que Tswett estava correto quanto às duas estruturas da clorofila, no entanto, a afirmação de Willstätter foi uma das razões que levaram ao esquecimento e desuso da cromatografia durante quase 25 anos (ENGELHARDT, 2004).

O método e os resultados obtidos por Willstätter, para o isolamento e a identificação da clorofila, foram apresentados em forma de livro em 1913 (WILLSTÄTTER, 1913) e o levaram a receber o prêmio Nobel de química em 1915 (NOBELPRIZE.ORG, 1915), tornando-o a principal referência no assunto. No livro, Willstätter afirma que a cromatografia de Tswett era uma estranha maneira de se obter compostos puros, e que de fato Tswett jamais havia lidado com substâncias puras.

Outras questões podem ser enumeradas e contribuíram para o que se chama de período de dormência da cromatografia, sendo elas verdades ou suposições, são ainda motivo de muita discussão entre historiadores (LIVENGOOD, 2009):

- 1- Químicos e botânicos não compreenderam o funcionamento do método de Tswett e cometeram erros aos empregá-los;
- 2- O livro publicado por Tswett em 1910 foi escrito em russo, língua inacessível à maioria dos pesquisadores da época;
- 3- Houve preconceito por parte dos químicos, pois um Botânico russo iniciante estava sugerindo uma revolução na química analítica;
- 4- Tswett passou por tragédias pessoais e profissionais, com a primeira grande guerra sabotando sua descoberta;
- 5- A rejeição de Willstätter e outros químicos alemães;
- 6- Antes de 1930 os químicos visavam o isolamento de grandes quantidades de componentes principais, e não a separação de todos os componentes do material de estudo;
- 7- Os resultados de Tswett discordavam dos obtidos com técnicas consideradas clássicas e confiáveis, como partição e recristalização.

2.1.6.1 A contribuição de Charles Dhéré

Após as declarações de Willstätter, apenas alguns poucos cientistas fizeram uso da invenção de Tswett. Um destes primeiros pesquisadores foi o francês Charles Dhéré (1876-1955). Dhéré graduou-se em medicina e em 1900 se tornou professor de fisiologia, química

biológica e microbiologia na Universidade de Friburgo na Suíça. Em 1909 termina seu doutorado e seu grande interesse científico era a investigação de substâncias com importância biológica, particularmente com técnicas espectroscópicas de ultravioleta e fluorescência (MEYER e ETTRE, 1992).

Para seus estudos espectroscópicos, Dhéré necessitava obter as substâncias de interesse em estado puro, desta maneira ele se dedicou ao estudo de técnicas para este fim, e assim Dhéré se aproximou da cromatografia. Por volta do ano de 1911, Dhéré iniciou seus trabalhos com cromatografia, apenas alguns poucos anos após as publicações de Tswett. Os trabalhos mais importantes foram as publicações de dois de seus alunos, Rogowski e Vegezzi (MEYER e ETTRE, 1992).

Wladyslaw Franciszek de Rogowski (1886-1945) nasceu em Varsóvia, ocupada então pela Rússia. Em 1911 Rogowski integra a equipe de Dhéré como aluno de doutorado e conduz estudo espectroscópico com as clorofilas. Rogowski conclui o doutorado em 1912, no entanto, sua tese apenas foi registrada em 1914. Neste documento está descrito com detalhes a técnica cromatográfica utilizada, bem como o aparato desenvolvido (MEYER e ETTRE, 1992).

O aparato de Rogowski consistia em uma coluna de vidro com 60 a 80mm de comprimento que não era afunilada na sua extremidade inferior, como a utilizada por Tswett, e sim fechada por uma cortiça perfurada que era acomodada sobre um disco de porcelana perfurado envolto por uma manga de vidro exterior (Figura 15). O adsorvente utilizado era carbonato de cálcio. Desta maneira, Rogowski podia retirar a rolha e remover com mais facilidade a fase estacionária após a separação dos pigmentos da mistura, separando mecanicamente os anéis coloridos de maneira a não ter mais os problemas de contaminação de substâncias presentes nos outros anéis (MEYER e ETTRE, 1992).

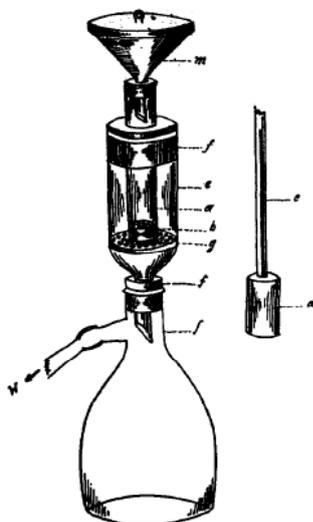


Figura 15 – Aparato cromatográfico usado por Rogowski. Com a coluna não afunilada na parte inferior era possível remover a fase estacionária com auxílio de um bastão de madeira.

Fonte: MEYER, 1992, p. 7.

Com esta técnica, Rogowski conseguiu isolar as clorofilas *a* e *b* além de alguns carotenoides para seus estudos espectroscópicos. Os resultados corroboraram os resultados de Tswett, que afirmou que a clorofila cristalizada não era uma substância pura, e sim uma mistura. O então método clássico para o isolamento das clorofilas foi proposto por Willstätter e colaboradores em 1913, e se utilizava de fracionamento em solventes imiscíveis e cristalização. Os espectros obtidos por Rogowski, apresentados em sua tese, são notavelmente

mais puros do que os apresentados por Willstätter em suas publicações. Estudos posteriores provaram que a clorofila *b* isolada por Willstätter apresentava contaminação da ordem de 15% com a clorofila *a*. O interessante é verificar que o fato de Rogowski não conseguir obter um espectro igual ao de Willstätter para a clorofila *b* o deixou bastante aborrecido, pois a banda faltante de seu espectro era justamente a contaminação por clorofila *a* decorrente do método clássico descrito por Willstätter, então autoridade no assunto (MEYER e ETTRE, 1992).

Após Rogowski, o próximo trabalho publicado pelo laboratório de Dhéré com a utilização e aprimoramento da técnica cromatográfica de Tswett foi a tese de mais um de seus alunos, Vergezzi (MEYER e ETTRE, 1992).

Gluglielmo Vergezzi (1890-1955) nasceu na Suíça e juntou-se a equipe de Dhéré em 1913, concluindo seu doutorado em 1916. O estudo conduzido por Vergezzi tratava da investigação espectroscópica de pigmentos presentes em invertebrados. Seus resultados foram publicados em seis publicações com coautoria de Dhéré. O aparato cromatográfico utilizado por Vergezzi diferia muito pouco do desenvolvido por Rogowski, agora a coluna estava inteira dentro do tubo de vidro para melhorar a visualização da separação cromatográfica (MEYER e ETTRE, 1992).

A importância do trabalho de Dhéré e de seus colaboradores não está apenas na confirmação das descobertas de Tswett, além de ser o primeiro na Europa a reconhecer a importância do método de Tswett, Dhéré foi o primeiro a publicar artigo em 1943 com uma discussão detalhada do trabalho científico de Tswett e de apresentar uma biografia do pai da cromatografia (MEYER e ETTRE, 1992).

2.1.6.2 A contribuição de Leroy Sheldon Palmer

Ao mesmo tempo em que Dhéré iniciou seus trabalhos com cromatografia na Europa, Leroy Sheldon Palmer (1887-1944) usou o método de Tswett em sua pesquisa sobre carotenoides nos Estados Unidos (ETTRE e WIXOM, 1993).

Palmer iniciou por volta de 1910 seus estudos na Universidade de Missouri com pigmentos de leite, concluiu sua tese de doutorado em 1913 sob o título “O principal pigmento amarelo natural da gordura do leite”. Em 1922, Palmer publicou o livro “Carotenoides e pigmentos relacionados. Os Cromolipideos”. Com esta publicação, Palmer se tornou uma das maiores autoridades sobre carotenoides, seu livro apresenta uma revisão detalhada sobre esta classe de pigmentos e sobre os métodos analíticos existentes, em especial a cromatografia de Tswett (PALMER, 1922; ETTRE e WIXOM, 1993).

A problemática abordada por Palmer se concentrava no fato observado da coloração da manteiga produzida com leite de vacas ser amarela na primavera e no verão, enquanto que no inverno a coloração tornava-se pouco intensa. Palmer sugeriu que a mudança na coloração da manteiga poderia estar relacionada com a alimentação das vacas, que no verão e primavera alimentavam-se de pastagens naturais enquanto no inverno alimentavam-se de vegetação seca ou armazenada (silagem), ou seja, não fresca. Por ser a coloração amarela da manteiga e outros derivados de leite a principal característica relacionada a sua qualidade, mesmo sabendo-se que não existe diferenças significativas no valor nutricional do produto, os produtores tentavam obter um produto natural o mais amarelo possível (PALMER, 1913).

A tese de Palmer foi o primeiro relato a estabelecer a relação direta entre a ingestão de carotenoides presentes na alimentação de vacas e a composição do leite e de seus derivados. Representou a primeira prova direta do fato dos pigmentos presentes no leite e nos tecidos animais serem os mesmos presentes na alimentação e, conseqüentemente, prova de que os animais não são capazes de produzi-los (ETTRE e WIXOM, 1993).

Palmer estendeu seus estudos da presença de carotenoides em algas, plantas, aves, peixes, anfíbios, insetos, em leite e tecidos animais de diversas espécies, incluindo seres humanos. Descobriu que alguns animais armazenam carotenoides seletivamente e outros não armazenam nenhum. Como exemplo, a galinha não armazena os carotenos de sua dieta, mas armazena as xantofilas em seus tecidos e na gema do ovo. Os ovinos, suínos e o coelho, não armazenam nenhum carotenoide em seus tecidos e no leite (PALMER, 1922; ETTRE e WIXOM, 1993).

Ao iniciar seus estudos sobre pigmentos, Palmer não seguiu o caminho óbvio que seria a metodologia de Willstätter de isolamento de pigmentos. Aparentemente, Palmer teve acesso aos originais dos artigos de Tswett publicados em 1906 e percebeu a superioridade do método, que só foi atestada no final da década de 1930 (ETTRE e WIXOM, 1993).

Palmer utilizou para suas separações um aparato cromatográfico recomendado por Tswett para separações de maiores volumes (Figura 11b página 16). Como adsorventes utilizou sacarose e inulina ao invés de carbonato de cálcio, seguindo as recomendações de Tswett para separação de substâncias que podem sofrer transformações químicas e estruturais em carbonato de cálcio. A não observação desta recomendação foi a principal causa da objeção de Willstätter ao método de Tswett, que afirmou que os pigmentos sofriam degradação quando submetidos à adsorção. Sabe-se hoje que a rejeição de Willstätter se deu por conta de descuido de seus assistentes que não leram cuidadosamente os trabalhos de Tswett e ignoraram as recomendações neles contidas (ETTRE e WIXOM, 1993).

Diferentemente de Dhéré e seus alunos, Palmer optou pela separação cromatográfica dos pigmentos pela eluição das frações de cada fase, ao invés de separar mecanicamente os anéis adsorvidos. As soluções de pigmentos isolados assim obtidas eram então estudadas espectroscopicamente e através de reações químicas (ETTRE e WIXOM, 1993).

Em sua publicação mais importante, o livro de 1922, Palmer dá a Tswett todo o crédito pelo método de separação. Apresenta ainda uma bibliografia com 13 publicações de Tswett.

Mesmo após os resultados obtidos por Palmer, um artigo de um dos tradutores de Willstätter tenta desacreditar o método de Tswett em 1929 (SCHERTZ, 1929). Finalmente, o próprio Willstätter encerra a discussão em uma publicação de 1933 (ETTRE e HORVATH, 1975):

Não é importante para o cientista se a sua própria teoria prova o certo no final. Nossos experimentos não são realizados para decidir se estamos certos, mas para obter novos conhecimentos. É por causa do conhecimento que aramos e semeamos. Não é inglorioso ter errado em teorias e hipóteses. Nossas hipóteses se destinam ao presente ao invés do futuro. Elas são indispensáveis para nós na explicação dos fatos, para avivá-los e mobilizá-los e acima de tudo, abrir um caminho em regiões desconhecidas em direção a novas descobertas.

Fonte: ETTRE, 1975, p. 422.

2.1.6.3 A redescoberta da cromatografia de Tswett

O aumento do interesse de químicos orgânicos por produtos naturais levou a uma redescoberta da cromatografia no final da década de 1920. Dentre os pesquisadores da época, destaca-se a pesquisadora britânica Katharine Hope Coward, considerada a quinta pessoa a trabalhar com cromatografia após Tswett. Katharine tinha como foco de seus estudos a identificação dos carotenoides, reproduziu com competência as separações em carbonato de cálcio descritas por Tswett e confirmou a existência de carotenoides muito semelhantes e de difícil separação (ENGELHARDT, 2004; ETTRE e MORRIS, 2004).

2.1.7 A cromatografia em camada delgada

A cromatografia em coluna aberta não foi muito difundida, provavelmente pela falta de robustez do método. No entanto, a cromatografia planar em papel, introduzida por Martin, tornou-se a primeira técnica cromatográfica microanalítica. Foi introduzido o termo fator de retardamento R_F . Devido à baixa velocidade de separação da cromatografia em papel, surgiu na Rússia em 1938 a cromatografia em camada delgada. A técnica consistia na aplicação de uma fina camada de adsorvente em placas de vidro. Cromatoplasmas foram desenvolvidas, inicialmente com a utilização de amido para fixação do adsorvente à placa, e na sequência o amido foi substituído por sulfato de cálcio. A cromatografia em camada delgada tornou-se metodologia analítica padrão em laboratórios de química orgânica e farmacêuticos. Ainda hoje, a metodologia é utilizada devido à sua simplicidade e velocidade. As suas desvantagens são a falta de automação, de reprodutibilidade e de exatidão para quantificação (ENGELHARDT, 2004).

2.1.8 A cromatografia gasosa

Em 1941, Martin e Synge publicam artigo com os resultados de uma nova forma de utilização de separação. Os autores enfrentavam dificuldades na separação de uma mistura de aminoácidos hidrolisados de proteínas, e tentaram uma separação baseada no fenômeno da partição. A ideia foi saturar sílica com água e então usá-la como fase estacionária. Desta maneira, a fase estacionária seria um líquido imobilizado, agindo a sílica apenas como um suporte, e a fase móvel seria outro líquido imiscível em água. A separação era fundamentada na diferença de partição das substâncias entre as duas fases líquidas, e não mais nas diferenças de adsorção. As separações dos aminoácidos ainda eram dificultadas pelo fato de serem substâncias incolores. Martin utilizava-se de indicadores misturados à água aplicada na sílica para visualização da separação. Os autores apresentam seus resultados como sendo uma solução rápida e barata, em termos de material e aparatos, para a separação de hidrolisados de aminoácidos. Concluem ainda que seu método poderia ser utilizado também para separação de substâncias neutras, separadas pelas diferenças entre seus coeficientes de partição. No entanto, a mais impressionante contribuição da publicação foi a seguinte previsão (MARTIN e SYNGE, 1941):

A fase móvel não necessariamente precisa ser um líquido, mas pode ser um vapor [...] Separações muito refinadas de substâncias voláteis podem ser conseguidas em uma coluna onde um gás permanente seja forçado a fluir através de gel impregnado com um solvente não volátil [...].

Fonte: MARTIN, 1941, p. 1359.

Apesar de não ser o foco da publicação, o artigo antecipa a criação da cromatografia gasosa, que foi finalmente introduzida em 1952. Com a intensificação do seu uso, estimulado pela evolução da petroquímica, surgiram os estudos cinéticos que levaram às equações de eficiência que regem os fenômenos das separações cromatográficas (ENGELHARDT, 2004).

Em 1952, Syngé e Martin são laureados com o prêmio Nobel de Química pela invenção da cromatografia de partição (NOBELPRIZE.ORG, 1952).

Hoje, os cromatógrafos gasosos estão de tal maneira difundidos que existe um equipamento funcionando remotamente na superfície de Marte para estudos de composição do solo e atmosférica, acoplado como instrumento de bordo do jipe “*curiosity*” da Nasa, que aterrissou no planeta em 2012.⁴

2.1.9 A contribuição de Tiselius e Claesson

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902-1971) e Stig Melker Claesson (1917-1988) foram dois pesquisadores do Instituto de Físico-Química da Universidade de Uppsala na Suécia. Promoveram ao menos duas grandes contribuições para a evolução da cromatografia, a primeira é a incorporação de um sistema de detecção não visual ao aparato cromatográfico, a segunda é a criação da cromatografia de deslocamento.

Em 1941, Tiselius publica artigo sobre o desenvolvimento de um novo aparato para a análise de adsorção de Tswett, trata-se da incorporação de uma cubeta para leitura óptica acoplada ao fluxo de efluente da coluna cromatográfica, desta maneira, era possível observar bandas correspondentes ao número de substâncias presentes na amostra. Tiselius demonstra ainda ser possível a determinação qualitativa e quantitativa dos componentes. O método desenvolvido aplicava-se não apenas a substâncias coloridas e era de fácil adaptação para determinações quantitativas. A Figura 16A reproduz uma curva obtida por Tiselius em uma de suas análises (TISELIUS, 1941).

Em 1948, Claesson publica um artigo onde apresenta um diagrama com um sistema de leitura do efluente da coluna, conforme idealizado por Tiselius (Figura 16B). O diagrama ainda apresenta o acoplamento de um sistema de introdução da fase móvel, na forma de um compartimento pressurizado por um êmbolo (CLAESSON, 1948).



Figura 16 – (A) Fotografia de um dos experimentos de cromatografia de adsorção de Tiselius e (B) Diagrama de dispositivo para cromatografia.

Fonte: **A** - TISELIUS, 1941, p. 146. **B** - CLAESSON, 1948, p. 183.⁵

⁴ Disponível em: <<http://mars.jpl.nasa.gov/msl/multimedia/images/?ImageID=5199>>. Acesso em: 23 Jan 2014.

⁵ Figura B redenhada pelo autor com base na imagem original.

Tiselius classifica a cromatografia em três métodos distintos de eluição (SYNGE, 1949):

- 1- Análise frontal – A mistura original é continuamente passada através da coluna, procedimento adotado por Goppelsroeder na análise capilar (item 2.1.4 página 11);
- 2- Eluição com solvente – A mistura original é colocada na coluna em pequeno volume e então levada através da coluna com adição de solvente puro, método usado por Tswett;
- 3- Eluição por deslocamento - A mistura original é colocada na coluna em pequeno volume e então lavada com solução de um agente de deslocamento.

2.1.9.1 A cromatografia de deslocamento

A cromatografia de deslocamento foi introduzida por Tiselius em 1943, nela, as substâncias a serem separadas são adsorvidas no topo da coluna, uma solução contendo outra substância que seja mais fortemente adsorvida pelo adsorvente é então passada através da coluna fazendo com que o analito seja desorvido e, conseqüentemente, eluído. A técnica se aplica muito bem para análises preparativas, qualitativas e quantitativas, sendo os resultados limitados pela dificuldade de se encontrar o agente de deslocamento ideal em separações de misturas desconhecidas (CLAESSON, 1949).

A técnica desenvolvida por Tiselius e Claesson foi aplicada com muito sucesso na separação de aminoácidos em colunas de troca iônica com eluição por deslocamento promovido pela variação de pH da fase móvel. Este tema será retomado mais a frente quando a técnica foi utilizada e otimizada por Moore e Stein.

2.1.9.2 Encontro para discussão de análises cromatográficas: *The Faraday Society*

A revista “*Discussions of the Faraday Society*” promoveu em 24 de Setembro de 1949, no Departamento de Química da Universidade Reading na Inglaterra, a “Discussão geral em Análises Cromatográficas”. Mais de 250 membros e visitantes estavam presentes, dentre os convidados e autores destacam-se: S. Claesson, S. Moore, A. Tiselius, A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, F. A. Robinson e S. M. Partridge. Este encontro colocou os principais usuários e desenvolvedores da cromatografia em contato, para troca de informações e atualização nos campos em desenvolvimento da cromatografia líquida e, por este motivo, pode ser considerado um importante marco na evolução da técnica (CHEMISTRY, 1949).

2.2 A contribuição de Moore e Stein

O primeiro cromatógrafo líquido automático, com eluição gradiente e com sistema de derivatização pós-coluna foi projetado com a colaboração de Darrel H. Spackman, por Moore e Stein para análise de aminoácidos. O contexto e as descobertas que levaram a publicação de 1958, com a descrição deste equipamento, é outro grande marco da história da cromatografia líquida.

2.2.1 Biografia de Stanford Moore e Willian H. Stein

Willian Howard Stein (1911-1980) graduou-se em Harvard em 1929 com especialização em química. Transferiu-se então para a Universidade de Columbia para estudar bioquímica, no departamento de Química Biológica. Concluiu sua tese na pesquisa da composição de aminoácidos da elastina em 1937. Em 1938, integrou-se ao laboratório de Max Bergmann, no Instituto de Pesquisas Médicas Rockefeller em Nova York. O projeto inicial de Stein com Bergmann era a análise de aminoácidos (KRESGE *et al.*, 2005).

Stanford Moore (1913-1982), graduado na Universidade de Vanderbilt, e com recente doutorado na Universidade de Wisconsin, se juntou ao laboratório de Max Bergmann em 1939. Moore e Stein, recém doutores, concentram esforços no desenvolvimento de métodos gravimétricos para análise de aminoácidos (KRESGE *et al.*, 2005).

A pesquisa dos colegas foi interrompida pela guerra. Em 1944, Max Bergmann falece e seu laboratório perde quase todos os pesquisadores, que assumem outras atividades. Em 1945, Moore e Stein (Figura 17) recebem a oportunidade de chefiar e dar continuidade ao trabalho de Bergmann nas análises de aminoácidos (KRESGE *et al.*, 2005).

A lealdade de Moore com a Universidade Rockefeller, onde trabalhou até o fim de sua carreira, e a sua devoção à bioquímica, são refletidos em seu testamento, que legou seus bens à Universidade para serem usados para apoiar a pesquisa no campo da bioquímica (KRESGE *et al.*, 2005).

O trabalho de Stein e Moore com a elucidação da sequência de aminoácidos da enzima ribonuclease, bem como de sua estrutura espacial, levou ambos a dividirem com Christian B. Anfinsen o Prêmio Nobel de Química de 1972 (NOBELPRIZE.ORG, 1972).



Figura 17 – Stanford Moore (esquerda) e William Howard Stein (direita).

Fonte: Fundação Nobel, 1972.⁶

A produção bibliográfica da dupla de cientistas do Laboratório do Instituto Rockefeller de Pesquisas Médicas de Nova York e, conseqüentemente, a enorme contribuição à comunidade científica pode ser demonstrada com a apresentação de seus principais artigos.

⁶ Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/>. Acesso em: 2 Nov 2012.

2.2.2 A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de amido

Syngé já havia realizado experimentos qualitativos de separação de aminoácidos em colunas de amido, demonstrando a possibilidade de fracionamento de misturas em quantidades suficientes de modo a permitir análises posteriores por técnicas convencionais. O procedimento aparentemente poderia ser desenvolvido de modo quantitativo para a análise de aminoácidos (STEIN e MOORE, 1948). Este foi o objetivo do trabalho de Stein e Moore, cujos resultados foram publicados em 1948.

Neste estudo, Stein e Moore aplicaram misturas sintéticas de aminoácidos em colunas de amido, coletaram uma série de pequenas frações do efluente com volume conhecido. Posteriormente, procederam a análise quantitativa das frações. Os resultados assim obtidos permitiram a construção de curvas de concentração de efluente que revelaram a separação e a eficiência da coluna de amido. A Figura 18 apresenta uma destas curvas, o eixo x representa a fração coletada (volume de efluente coletado) e o eixo y a concentração determinada espectrofotometricamente pelo método de reação colorimétrica com ninidrina.

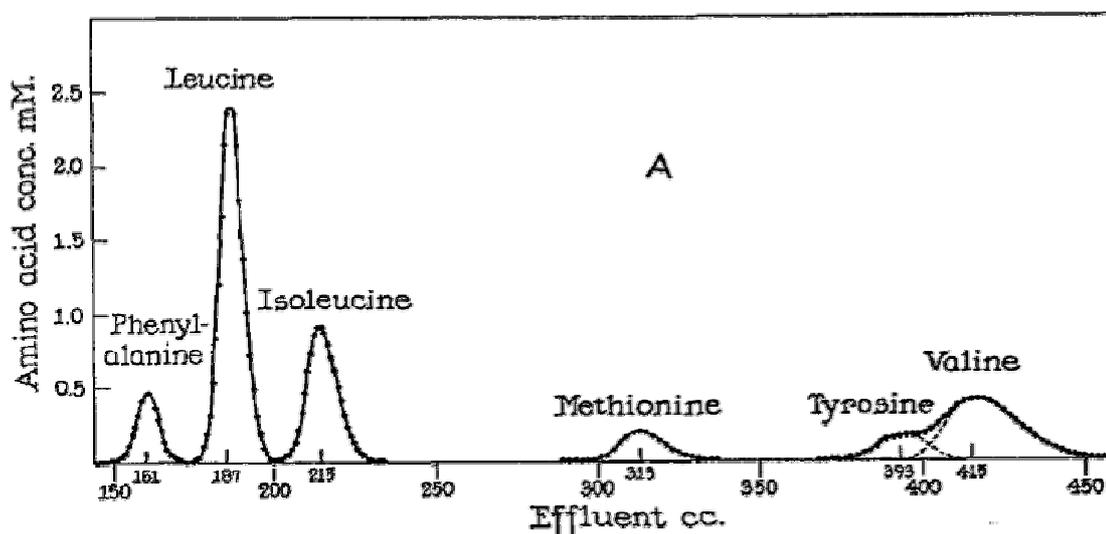


Figura 18 – Curva de uma separação de aminoácidos em coluna de amido.

Fonte: STEIN, 1948, p. 338.

As colunas cromatográficas eram preparadas com amido de batatas, tinham aproximadamente 30 centímetros de comprimento por 0,9 de diâmetro, os cuidados na sua preparação permitiram resultados excelentes de reprodutibilidade.

Inicialmente, as frações do efluente eram coletadas manualmente. No entanto, devido ao grande número de experimentos, foi desenvolvida uma máquina capaz de coletar automaticamente as frações. O artigo traz detalhes técnicos do coletor de frações desenvolvido. As frações eram coletadas em tubos de ensaio colocados em um rack contendo até 320 tubos dispostos em círculos concêntricos. Cada gota de efluente da coluna atravessava um feixe de luz, deste modo, o mecanismo contava automaticamente o número de gotas. Ao chegar ao número de gotas estabelecido, 20 a 40 dependendo do solvente utilizado, o mecanismo zerava o contador e acionava um motor que fazia o rack girar para o próximo tubo, desta maneira era possível coletar frações de 0,5 mililitros. O artigo traz detalhes, plantas, marcas e modelos dos componentes utilizados para a construção do coletor de frações.

Para realizar uma corrida típica, como a da Figura 18 da página 28, era necessária a operação contínua do mecanismo durante aproximadamente 4 dias.

A fim de padronizar e aumentar o fluxo do solvente através de suas colunas de amido, Stein e Moore adaptaram uma seringa ao topo da coluna, desta maneira, o fluxo pôde ser otimizado para melhorar a resolução dos picos.

A identificação dos picos foi razão de exaustivos experimentos com misturas conhecidas de aminoácidos, análises colorimétricas específicas e com experimentos de adição de padrão, onde se verificava o incremento do pico referente ao aminoácido adicionado à mistura. Os autores ainda ressaltaram que na separação de misturas complexas, muito cuidado deveria ser tomado, levando em conta informações úteis como a posição absoluta de cada pico, sua posição relativa a outros picos e que qualquer grau de assimetria dos picos poderia revelar a presença de substâncias inesperadas.

A repetitividade dos experimentos de Moore e Stein era de aproximadamente 3%, a recuperação para aminoácidos individuais era de 98 a 99%, valores que podem ser considerados incríveis devido ao material utilizado, em especial a fase estacionária.

No mesmo volume da revista onde foi publicado o artigo sobre a separação de aminoácidos em colunas de amido, Stein e Moore publicam um segundo artigo descrevendo a otimização do método de detecção dos aminoácidos com a reação de derivatização com ninidrina (MOORE e STEIN, 1948).

A preocupação era agora com o método de detecção dos aminoácidos presentes no efluente da coluna de separação, era necessária a aplicação de um método simples, rápido e sensível. O método deveria ser capaz ainda de detectar peptídeos presentes em hidrolisados de proteínas e fluidos biológicos.

Existiam dois métodos colorimétricos na época para derivatização de amins, de modo que o escolhido foi o da reação com ninidrina (Figura 19), que já havia sido extensivamente estudada no passado. O método era bastante sensível para reações com α -aminoácidos, no entanto, os resultados se mostravam pouco repetitivos devido à instabilidade do derivado formado. A presença de oxigênio do ar no meio de reação era o motivo desta degradação. Moore e Stein desenvolveram um meio de proceder a reação em tubos evacuados, deste modo, a relação entre a cor desenvolvida e a concentração dos aminoácidos era mais linear. A adição de um agente forte de redução ao meio reacional fez com que o sítio suscetível a oxidação da molécula fosse eliminado (MOORE e STEIN, 1948).

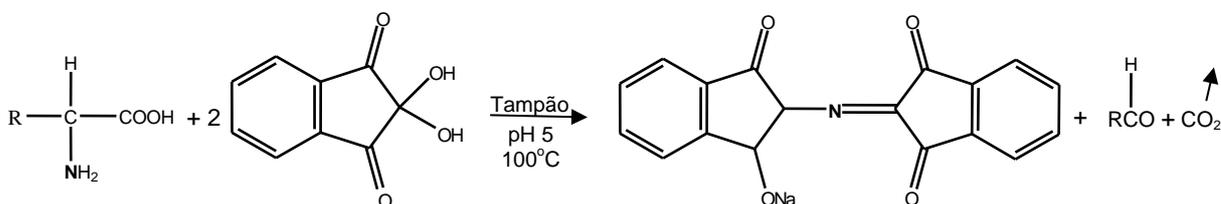


Figura 19 – Reação de derivatização de α -aminoácidos com a ninidrina.

Fonte: MOORE, 1948, p. 368.

Quando as condições reacionais foram estabelecidas, Moore e Stein realizaram extensivos estudos com diversos aminoácidos a fim de determinar os efeitos de variações de pH, temperatura, tempo de reação e concentração dos reagentes.

A quantidade de frações coletadas sempre era grande, dessa maneira, Moore e Stein tentavam ao máximo mecanizar e automatizar o procedimento. Para realizar as reações com

ninidrina, racks de cubetas de espectrofotômetro eram adaptados em banhos de aquecimento, sistemas com pipetas adaptadas a sistemas de vácuo eram alimentadas por frascos de reagentes com atmosfera modificada para evitar a presença de oxigênio.

Como conclusões de seus experimentos, Moore e Stein definem as condições ótimas da reação de ninidrina: “A reação é conduzida em pH 5 e à 100°C. A absorvância máxima do produto azul da reação é em 570nm. A exatidão, para aminoácidos individuais é de 2%. O procedimento foi mecanizado de modo a permitir a análise de um grande número de amostras em rotina” (MOORE e STEIN, 1948).

Em 1949, Moore e Stein continuam as publicações com os resultados de suas pesquisas de separação de aminoácidos em colunas de amido. Estudo metucioso foi realizado a fim de otimizar a separação de hidrolisados de proteínas, em especial com a avaliação de diferentes misturas de solventes para a eluição. Eluições em modo gradiente foram estabelecidas de modo a melhorar a resolução e reduzir o tempo de análise, que poderia chegar a 7 dias. Os cuidados com a contaminação dos tubos coletores de frações também são discutidos no artigo, em especial contaminações com amônia e resíduos de análises anteriores.

Para ajustar o pH das frações coletadas, os pesquisadores adaptaram uma bureta ao coletor automático de frações, de modo que no decorrer da coleta as amostras eram automaticamente neutralizadas com solução de NaOH (MOORE e STEIN, 1949).

Ainda em 1949, Stein e Moore publicam segundo artigo com os resultados da análise dos aminoácidos de duas proteínas de plasma bovino. O cromatograma da Figura 20 traz a separação dos aminoácidos de uma amostra de hidrolisado de uma dessas proteínas.

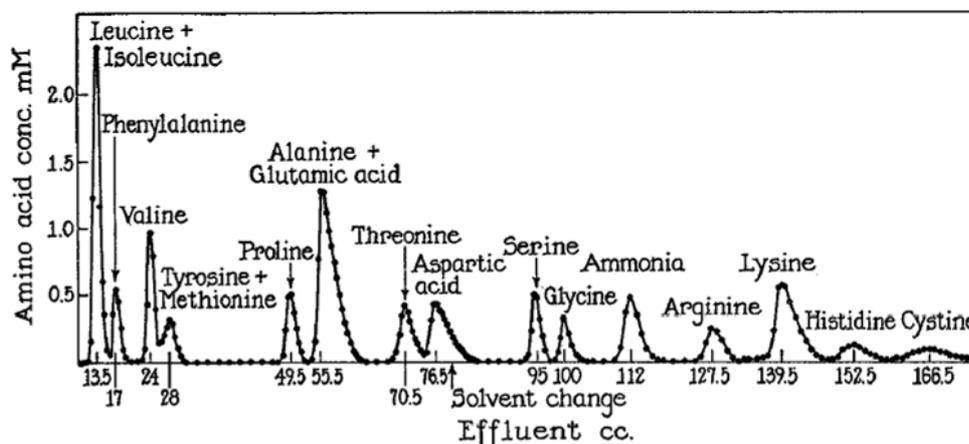


Figura 20 – Fracionamento cromatográfico de hidrolisado de albumina de soro bovino.

Fase móvel: 1:2:1 n-butil álcool, n-propil álcool e HCl 0,1N e

2:1 n-propil álcool e HCl 0,5N

Coluna: 0,9x30cm e aplicação de equivalente a 2,5mg de proteína hidrolisada

Fonte: STEIN, 1949, p. 54.

A pequena quantidade de amostra aplicada na coluna cromatográfica permitiu a Stein e Moore reduzir as quantidades necessárias de amostra a ser hidrolisada, trabalhando em microescala de 25 a 50mg de amostra, 10 vezes menos que a quantidade tradicionalmente utilizada (STEIN e MOORE, 1949).

2.2.3 A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de troca iônica

2.2.3.1 A contribuição de Partridge

Paralelamente ao trabalho de Moore e Stein, com as separações de aminoácidos em colunas de amido, muitos pesquisadores estavam utilizando resinas de troca iônica na separação de eletrólitos orgânicos. Em especial, o pesquisador S. M. Partridge, do laboratório de pesquisa em bioquímica e biofísica da Universidade de Cambridge na Inglaterra, que publicou de 1949 a 1952 uma série de trabalhos sobre o assunto. A série de trabalhos contém oito publicações com os seguintes títulos:

Cromatografia de deslocamento em resinas sintéticas de troca iônica:

- Parte 1 – Separação de bases orgânicas e aminoácidos usando resinas de troca catiônica (PARTRIDGE e WESTALL, 1949);
- Parte 2 – Separação de ácidos orgânicos e aminoácidos ácidos pelo uso de resinas de troca aniônica (PARTRIDGE e BRIMLEY, 1949);
- Parte 3 – Fracionamento de um hidrolisado de proteína (PARTRIDGE, 1949a);
- Parte 4 – Isolamento de glucosamina e histidina de um hidrolisado protéico (PARTRIDGE, 1949b);
- Parte 5 – Separação de aminoácidos básicos (PARTRIDGE e BRIMLEY, 1950);
- Parte 6 – Efeito da temperatura na ordem do deslocamento (PARTRIDGE e BRIMLEY, 1951a);
- Parte 7 – Separações usando uma resina básica forte (PARTRIDGE e BRIMLEY, 1951b);
- Parte 8 – Um método sistemático para a separação de aminoácidos (PARTRIDGE e BRIMLEY, 1952).

A metodologia usada por Partridge consistia na aplicação da cromatografia de deslocamento, desenvolvida por Tiselius e Claesson, usando como fase estacionária resinas de troca iônica. A solução com a mistura a ser separada era introduzida na coluna e os componentes separados pela introdução de uma fase móvel contendo uma base ou um ácido mais fortemente adsorvido pela resina. Os componentes da mistura eram então sucessivamente deslocados e eluíam da fase estacionária. Como os componentes da mistura não formavam bandas claramente visualizáveis, técnicas analíticas contínuas para medir as alterações do efluente da coluna eram necessárias para determinações qualitativas e quantitativas. Métodos para este propósito já haviam sido sugeridas por Claesson (CLAESSON, 1947), e os principais deles para esta medição eram a utilização de um eletrodo para medir continuamente a condutividade elétrica ou o pH do efluente, ou ainda a titulação de sucessivas pequenas alíquotas. A Figura 21 da página 32 mostra o esquema do acoplamento de um eletrodo à saída da coluna para determinação da condutividade elétrica ou o pH do efluente de maneira contínua (PARTRIDGE e WESTALL, 1949).

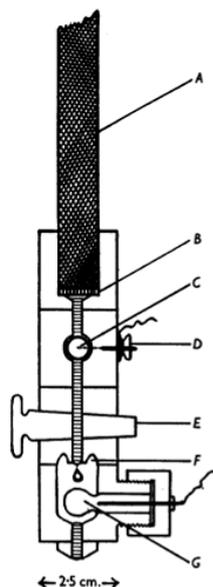


Figura 21 – Acoplamento de eletrodos para medição da condutividade elétrica e pH do efluente da coluna cromatográfica. (A) Fase estacionária; (B) Disco perfurado com lã de vidro; (C) Célula com eletrodos para condutividade elétrica; (D) Terminais dos eletrodos; (E) Regulagem de fluxo; (F) Célula do eletrodo e (G) Potenciômetro de pH.

Fonte: PARTRIDGE, 1949, p. 419.

Em dezembro de 1945, a companhia americana DOW lança uma resina de troca catiônica com alta capacidade e com excelente estabilidade química, comercialmente disponível com o nome de DOWEX 50. Em 1948, o uso da resina DOWEX 50 se populariza, especialmente no pré-tratamento de água de uso industrial. Com base polimérica sulfonada, a resina tem aplicação na desmineralização de água, fornecendo uma capacidade de aproximadamente o dobro das resinas então disponíveis no mercado, além disso, podiam ser utilizadas em larga faixa de pH e sob temperaturas de até 100°C. Sua forma esférica perfeita permitiu melhor empacotamento e, conseqüentemente, melhor uniformidade de fluxo e aumento de sua capacidade. Além disso, estavam disponíveis partículas uniformes de até 0,04µm (BAUMAN *et al.*, 1948).

2.2.3.2 Moore e Stein adotam as colunas de resinas de troca iônica

O desenvolvimento de separações cromatográficas de aminoácidos usando resinas de troca iônica como fase estacionária, teve por objetivo a substituição das separações em colunas de amido. As colunas de amido, até então estudadas em detalhes por Moore e Stein, apresentavam desvantagens, como a necessidade de dessalinização de fluidos com alta concentração de sais, como os fluidos biológicos. A utilização da resina DOWEX 50 mostrou-se livre desses problemas (MOORE e STEIN, 1951).

Moore e Stein iniciam estudo para otimização da separação quantitativa de aminoácidos em resina de troca iônica, no entanto, ao contrário de Partridge, insistem na eluição em detrimento da cromatografia de deslocamento. Para isto, utilizam eluição com tampões com pH progressivamente incrementados. Ao contrário do deslocamento, os tampões são menos agressivos que a eluição com ácidos e causam menos interferência no método de detecção com a reação com ninidrina. A separação de misturas de aminoácidos se mostrou

mais favorável em coluna de troca iônica comparativamente às de amido anteriormente utilizadas. A análise se mostrou ainda duas vezes mais rápida com as colunas de troca iônica, tendo a separação completa dos aminoácidos em 5 dias (MOORE e STEIN, 1951).

Em 1952, Moore e Stein publicam artigo onde apresentam a separação de aminoácidos em uma escala maior com fins preparativos. São usadas colunas bem maiores que as até então construídas, a fase estacionária utilizada continuou sendo a resina DOWEX 50. Deste modo, foi possível o isolamento de misturas com até 300mg de aminoácidos, de maneira quantitativa e com obtenção de aminoácidos isolados em quantidades relativamente grandes. Foram utilizadas colunas de 7,5cm de diâmetro e até 120cm de comprimento. A Figura 22 apresenta o esquema de montagem dessas colunas. Foi também desenvolvido um sistema para inserção de eluente via frasco pressurizado, dessa maneira, era possível controlar e manter o fluxo constante através da coluna com o ajuste da pressão do ar comprimido aplicado dentro do frasco (HIRS *et al.*, 1952). Sistema semelhante foi desenvolvido por Tswett (item 2.1.5.4 página 16), que mantinha o frasco pressurizado com a utilização de sistema manual de bombeamento de ar. Claesson (1948) também desenvolveu sistema de pressurização com a utilização de um êmbolo no recipiente de armazenamento de fase móvel (item 2.1.9 página 25).

As colunas preparadas com resina de troca iônica ainda tinham a vantagem de poderem ser reutilizadas, bastando reequilibrá-las com a fase móvel inicial utilizada para a separação.

Utilizando as colunas de 7,5cm de diâmetro, Moore e Stein conseguiram isolar não apenas aminoácidos, também isolaram a enzima pancreática ribonuclease, chegando a obter 45mg de enzima pura (HIRS *et al.*, 1953). A medida que Moore, Stein e colabores avançavam nos estudos bioquímicos, a metodologia de análise cromatográfica avançava na mesma velocidade de suas descobertas. Após o isolamento cromatográfico da ribonuclease, a próxima etapa foi determinar a composição de seus aminoácidos (HIRS *et al.*, 1954).

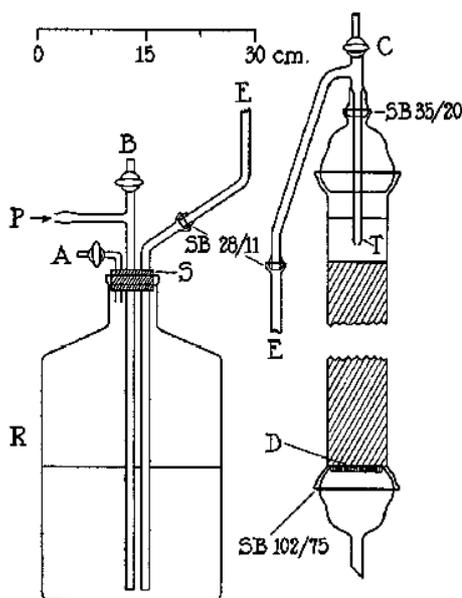


Figura 22 – Diagrama para acoplamento de frasco de eluente pressurizado para alimentação da coluna de separação.

Fonte: HIRS, 1952, p. 674.

O método de detecção do efluente das colunas de resina iônica também foi melhorado, desta maneira, ele ficou mais rápido, menos sensível a interferências e mais sensível (MOORE e STEIN, 1954a). O método cromatográfico também foi melhorado de maneira a possibilitar a

completa resolução de uma mistura de 50 aminoácidos e pequenos peptídeos. A eluição era feita com uma contínua mudança na força iônica e no pH da fase móvel, desta maneira, não era mais necessária a troca manual da fase móvel e não ocorriam variações bruscas na composição da fase móvel com conseqüente perda de resolução cromatográfica, os picos tornaram-se mais intensos, finos e simétricos. A temperatura da coluna também era controlada e alterada durante a análise para melhorar a separação. Diversas adaptações e conexões foram necessárias para adaptar as colunas e os diversos frascos de solventes das fases móveis e das soluções de regeneração das resinas. Uma análise completa demorava uma semana nas condições estabelecidas (MOORE e STEIN, 1954b).

2.2.4 Aplicações analíticas da separação cromatográfica em colunas de troca iônica

Como imediata aplicação do método após as melhorias, Moore e colaboradores determinaram a composição de aminoácidos do leite materno humano, o que representou um padrão de referência para a nutrição infantil (SOUPART *et al.*, 1954).

A composição de aminoácidos livres do plasma humano também foi objeto de estudo. A Figura 23 apresenta um cromatograma completo, ou curva de efluente como denominado pelos autores, obtido neste trabalho. O cromatograma inclui, além da identificação dos picos, todas as alterações na fase móvel, volume de eluição e as variações de temperatura aplicadas às colunas (STEIN e MOORE, 1954).

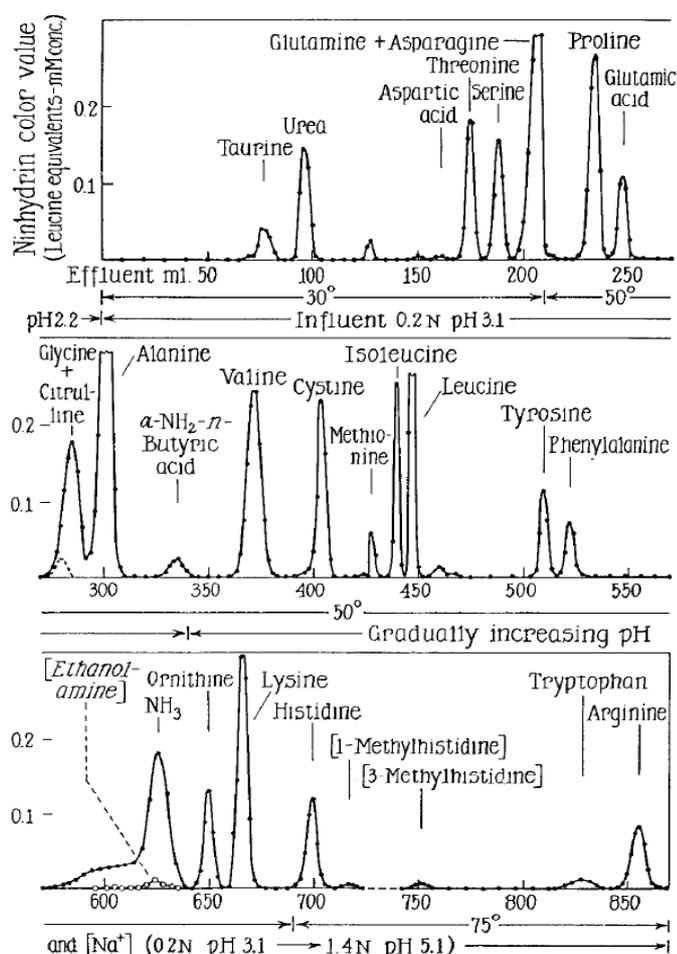


Figura 23 – Curva de efluente de uma determinação de aminoácidos livres no plasma de sangue humano.

Fonte: STEIN, 1954, p. 918.

A cada dia o método cromatográfico para determinação de aminoácidos ganhava mais adeptos e os resultados de sua aplicação aumentavam. A análise da composição de aminoácidos da urina humana também foi objeto de estudo, apesar de já ter sido avaliado por outros métodos, a separação em colunas de troca iônica levou a descoberta e ao isolamento de dois novos constituintes, a 3-metilhistidina e a tirosina-o-sulfato (STEIN, 1953; TALLAN *et al.*, 1954; TALLAN *et al.*, 1955).

A partir de 1956, o foco dos pesquisadores Moore, Stein e colaboradores, se voltou para o estudo estrutural da enzima ribonuclease, enzima que já havia sido objeto de seus estudos. Os trabalhos agora se centravam em determinar a sequência de aminoácidos de peptídeos formados por hidrólise parcial da ribonuclease com uso de diferentes técnicas de hidrólise. Os peptídeos formados eram então isolados por cromatografia em coluna de troca iônica e então hidrolisados para identificação de seus aminoácidos (BAILEY *et al.*, 1956; HIRS, MOORE, *et al.*, 1956; HIRS, STEIN, *et al.*, 1956).

2.2.5 O cromatógrafo de Moore e Stein

Após uma série de publicações com os resultados de investigações bioquímicas, que se utilizaram da cromatografia em resinas de troca iônica para determinações de aminoácidos e peptídeos hidrolisados de enzimas, a dupla de pesquisadores volta a relatar a evolução da metodologia alcançada durante suas pesquisas. São de 1958 duas publicações que apresentam os detalhes do método e da instrumentação construída.

A primeira destas publicações apresenta as melhorias dos procedimentos para a separação de aminoácidos em resinas de poliestireno sulfonado. A utilização de resinas com partículas menores permitiu a eluição em fluxos mais altos, e a escolha apropriada das fases móveis simplificou a operação. A análise completa de hidrolisados proteicos era realizada agora em 48 horas com a metodologia de coleta automática de frações, e em 24 horas com equipamento de registro automático (MOORE *et al.*, 1958).

Duas colunas eram necessárias para a separação de todos os aminoácidos, uma com resina Amberlite IR-120 de 150 centímetros, e outra com resina DOWEX-50X8 de 15 centímetros. Ambas as colunas podiam ser utilizadas repetidamente em temperatura fixa de 50°C. Apenas duas soluções tampão foram usadas, sendo necessária apenas uma mudança de eluente durante a análise. Desta maneira, foi possível obter uma linha base muito mais estável ao longo da análise (MOORE *et al.*, 1958).

Com a utilização de resinas com tamanho de partícula menores, foi possível aumentar o fluxo da fase móvel para valores superiores a 30mL/hora. Para isso, foi necessária a utilização de uma bomba posicionada entre a coluna e o frasco de tampão, ao invés da pressurização dos frascos de eluente com ar. As tubulações e conexões também foram trocadas por material capaz de suportar as maiores pressões geradas pelo sistema de bombeamento (MOORE *et al.*, 1958).

A segunda publicação (SPACKMAN *et al.*, 1958), no mesmo volume do mesmo periódico da publicação anterior, traz o diagrama do cromatógrafo desenvolvido e construído por Moore e Stein (Figura 24 página 36). O equipamento construído foi fruto da necessidade de um método mais preciso, rápido e menos trabalhoso. A análise completa de aminoácidos era agora realizada em apenas 24 horas, com grau de automação que exigia atenção mínima do operador, quando comparada ao método até então usado.

O artigo traz ainda explicações detalhadas de todos os componentes utilizados e/ou construídos, além dos procedimentos para sua operação que certamente são até os dias de hoje excelentes orientações para operadores dos atuais sistemas cromatográficos. Por esta razão,

os detalhes do artigo valem uma exploração minuciosa que será realizada a seguir com uma avaliação dos componentes do sistema cromatográfico construído.

Até então, a identificação dos aminoácidos separados em colunas de troca iônica era feita através da coleta de pequenas e numerosas frações de efluente da coluna. Posteriormente, adicionava-se uma solução de ninidrina e determinava-se a absorvância de cada fração em espectrofotômetro. No equipamento agora construído, a solução de ninidrina era bombeada constantemente e misturada ao fluxo de efluente da coluna. A reação ocorria em uma bobina de teflon colocada em um banho de aquecimento. Após a reação, o fluxo deste reator passava através de um fotômetro construído especialmente para determinar a absorvância do efluente, e a ele estava conectado um registrador de papel.

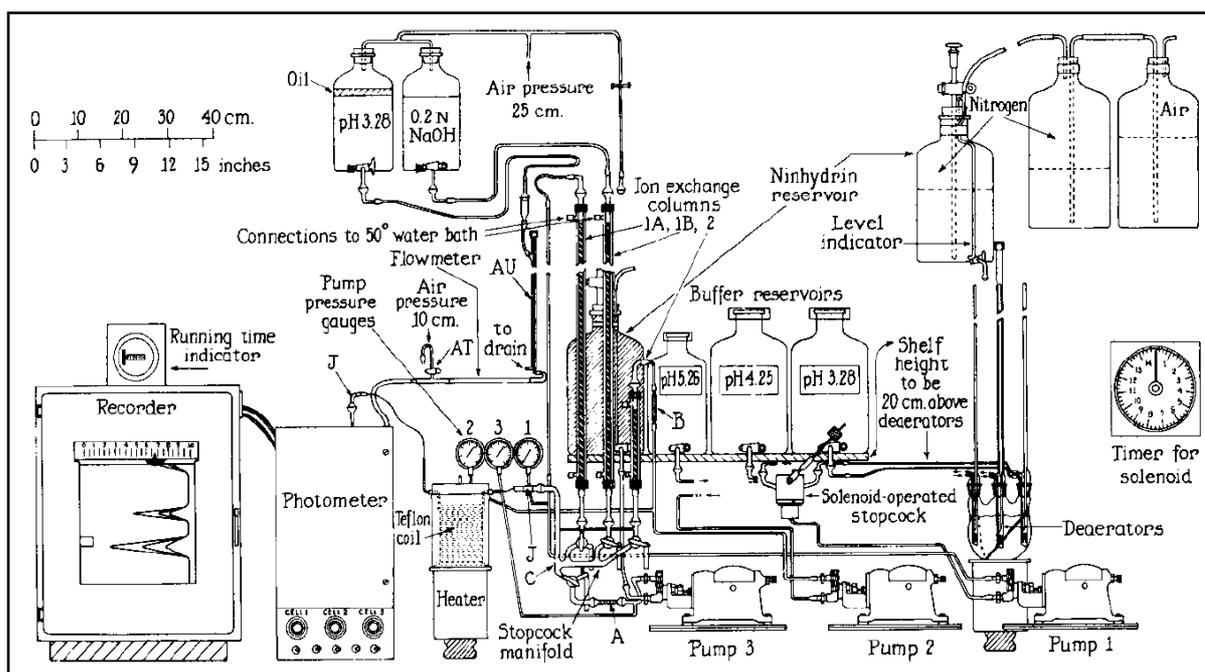


Figura 24 – Diagrama do cromatógrafo construído por Moore e Stein.
Fonte: SPACKMAN, 1958, p. 1191.

2.2.5.1 Sistemas de bombeamento

Para a garantia de um método preciso e contínuo, o eluente e a solução de ninidrina usada para a reação colorimétrica, deveriam ser bombeados de forma constante e controlada com bombas confiáveis. Para a construção do equipamento ilustrado na Figura 24, foram utilizadas três bombas com pistões de aço. Duas para o bombeamento das soluções tampão de eluição e a outra para a solução de ninidrina. Cada bomba estava equipada com duas válvulas de retenção (*check valves*), uma na alimentação do pistão e outra na saída. O fluxo podia ser regulado com um parafuso de regulagem do curso do pistão. Os tampões eram bombeados a 30mL/h e a ninidrina a 15mL/h.

Os detalhes de conexões, tubulações e marcas de todo o material utilizado estão no artigo. Os autores detalham ainda a operação e os cuidados a serem tomados para o correto funcionamento das bombas. Especial atenção é dada ao problema de formação de bolhas de ar, é chamada a atenção para a remoção total do ar dos pistões das bombas e para se evitar a inserção de ar através do término da fase móvel ou do sistema de deaeração. A principal causa

de variações de fluxo era a inserção de ar através das linhas de eluente ou conexões. A pressão de cada linha de saída das bombas era monitorada com o auxílio de um nanômetro com escala de 0 a 60psi.

Para o correto funcionamento das bombas, era necessária uma pressão mínima de resistência na válvula de saída. A coluna de 150cm apresentava resistência suficiente para gerar a pressão necessária na bomba 1, no entanto a coluna de 15cm, alimentada pela bomba 2 e a bomba 3 da solução de ninidrina necessitavam uma resistência maior. Para atingir esta resistência, dois filtros de lã de vidro eram colocados nas linhas de saída destas bombas, indicados na Figura 24 da página 36 pelas letras A e B. Estes filtros geravam aproximadamente 25psi de pressão no sistema, combinados com a resistência das colunas, a pressão total chegava a 40psi.

2.2.5.2 Reservatórios para as fases móveis

Para o armazenamento das soluções tampão, eram utilizadas garrafas de 2 litros de capacidade para a solução de pH 5,26 e de 4 litros para as soluções de pH 4,25 e 3,28. As saídas eram posicionadas na base do frasco conectadas a tubos plásticos flexíveis. As garrafas eram mantidas em uma estante posicionada 20 centímetros acima do nível dos deaeradores e 30 acima das bombas, pois elas precisavam de pressão positiva na entrada para correto funcionamento. No topo dos frascos era colocado um tubo contendo ácido cítrico para absorver a amônia presente no ar, que entrava nos frascos à medida que o líquido era bombeado, desta maneira, evitava-se que houvesse geração de cor pela reação da ninidrina com a amônia. Cuidado especial era tomado para não posicionar as garrafas diretamente sobre as partes eletrificadas do instrumento, a fim de evitar acidentes.

Dois frascos de 2 litros contendo solução de NaOH 0,2N e solução tampão pH 3,28 eram posicionadas 25cm acima do nível do topo das colunas, estas soluções eram utilizadas para a regeneração da resina de troca iônica após o término da corrida cromatográfica. As linhas plásticas eram adaptadas diretamente nas colunas quando em utilização.

O frasco para a solução de ninidrina continha um tubo externo para visualização do nível da solução no frasco, isto se fazia necessário porque o frasco era envolvido com fita adesiva preta para impedir a entrada de luz. O topo do frasco era fechado com uma rolha de borracha com um tubo para a saída da solução e uma conexão para entrada de nitrogênio, já que a solução de ninidrina não podia ficar exposta ao ar.

O tubo da linha da solução de ninidrina continha uma seção recheada com lã de vidro não compactada, tendo como função a retenção de qualquer partícula em suspensão. A solução deveria passar facilmente, apenas com a força da gravidade, através da seção de filtragem a fim de não prejudicar a alimentação da bomba. A seção de filtragem era periodicamente limpa para remoção de partículas evitando a restrição do fluxo.

2.2.5.3 Sistema de deaeração das fases móveis

O fluxo das soluções tampão passava previamente por deaeradores, a fim de remover o ar dissolvido e evitar assim a formação de bolhas de ar quando a solução era misturada ao fluxo de ninidrina e passada pelo reator, que era mantido a 100°C pelo banho de aquecimento. A remoção do ar era realizada pela aplicação de aquecimento a 100°C, o ar removido era liberado através de um longo tubo que funcionava ainda como condensador para os vapores liberado da solução. Diferentemente do esquema da Figura 24 da página 36, um sistema foi

montado de modo a utilizar apenas um único banho de aquecimento contendo os deaeradores e a bobina para a reação com a ninidrina.

O frasco da solução tampão com pH 5,26 estava diretamente conectado à alimentação da bomba 2, as outras duas soluções tampão, de pH 4,25 e 3,28, estavam conectadas a uma válvula solenoide de três vias. A válvula solenoide estava conectada a bomba 1 (Figura 24 página 36). Desta maneira, era possível programar a válvula solenoide, com auxílio de um temporizador, para deixar passar uma ou outra solução tampão para alimentar a bomba, fazendo assim a troca da fase móvel durante a separação cromatográfica.

2.2.5.4 Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas eram construídas com tubos de vidro com 0,9cm de diâmetro. Para a construção das colunas de 150cm, eram usados tubos de 166cm de comprimento com uma placa sinterizada de porosidade média com 3mm de espessura para reter a resina de troca iônica. As colunas menores eram construídas de maneira similar, variando apenas o tamanho do tubo de vidro, que era de 25cm. Os tubos de vidro eram envoltos em uma camisa de vidro para circulação de água proveniente de banho de aquecimento, a fim de controlar a temperatura durante a separação cromatográfica.

Duas colunas de 150cm eram mantidas no sistema, desta maneira, era possível manter uma em uso enquanto a segunda coluna era regenerada para a próxima análise. As colunas estão identificadas na Figura 24 da página 36 com os rótulos 1A e 1B para as colunas de 150cm e 2 para a coluna de 15cm.

As colunas eram conectadas ao fluxo das bombas pela extremidade superior, na extremidade inferior havia um sistema com 3 válvulas em vidro para seleção manual da coluna em uso, e uma outra para misturar o fluxo do efluente da coluna com o fluxo de solução de ninidrina vindo da bomba 3, o diâmetro interno desses tubos de vidro era de 1 milímetro. As torneiras deste sistema eram presas com cliques metálicos para suportar a pressão do sistema, que era de aproximadamente 7psi durante a operação neste ponto.

2.2.5.5 Reator para derivatização com ninidrina

O fluxo da mistura do efluente da coluna e da solução de ninidrina proveniente da válvula de vidro era conduzido para uma bobina construída com um tubo de teflon de 29 metros de comprimento e 0,7 milímetros de diâmetro interno. A bobina era mantida submersa dentro de um banho de aquecimento a 100°C. Como o diâmetro interno do tubo de teflon variava de lote a lote, o volume interno da bobina era determinado gravimetricamente, para isso o tubo vazio era pesado e comparado com sua massa quando cheio de água. O valor determinado era utilizado para calcular o comprimento necessário do tubo para conter 11,25mL de solução, volume necessário para garantir a correta mistura da solução de ninidrina com o efluente em um fluxo total de 45mL/h, obtendo assim um tempo de residência no banho de aquecimento de 15 minutos, tempo necessário para o desenvolvimento máximo de cor da reação da ninidrina com os aminoácidos.

comprimento do tubo era possível calibrar o medidor de fluxo de modo que uma bolha que levasse 45 segundos para atravessá-lo corresponderia a um fluxo de 45mL/h, o aparato pode ser visualizado na Figura 24 da página 36.

2.2.5.7 Registrador automático

O registrador utilizado estava comercialmente disponível, consistia em um medidor de corrente de três pontos com velocidade de papel de 7,6 centímetros por hora. Dessa maneira, os dados dos três fotômetros individuais eram impressos simultaneamente em cores diferentes, sendo que a cada 4 segundos um valor de leitura era registrado através de um ponto. Os pontos eram posicionados tão próximos que o resultado final consistia em três linhas simultâneas de cores diferentes (Figura 26). O papel utilizado continha escalas vertical e horizontal, a escala horizontal podia ser lida diretamente como absorvância, e, desde que mantida a velocidade do papel e o fluxo do efluente, cada linha da escala horizontal representava 2mL do efluente da coluna.

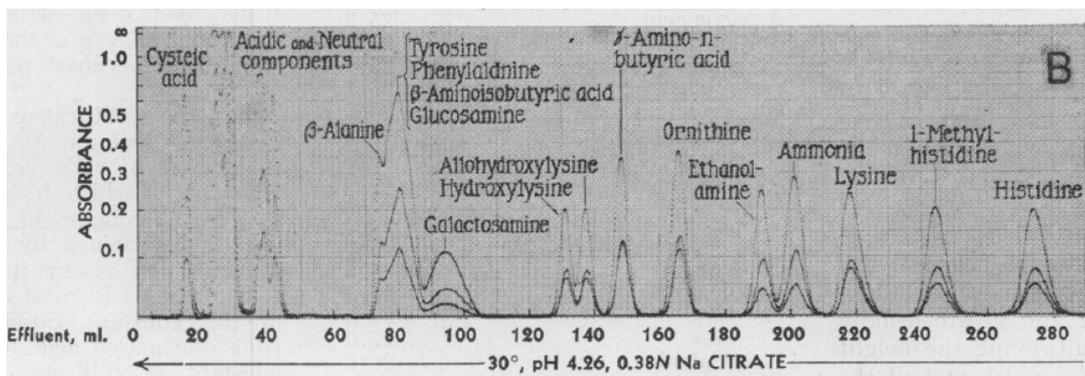


Figura 26 – Porção de um registro em papel de uma análise de aminoácidos realizada com o aparato de Moore e Stein.

Fonte: SPACKMAN, 1958, p. 1202.

2.2.6 Resumo sobre as contribuições de Stein e Moore para a cromatografia líquida

A genialidade inventiva da dupla dos amigos cientistas, juntamente com a escolha do objeto de estudo, os aminoácidos, levou à melhoria da separação cromatográfica e à automação de todo o processo, esta automação acabou ainda por resultar no primeiro sistema cromatográfico projetado e construído. Totalmente adaptado às necessidades e sem qualquer proteção intelectual, este sistema é o modelo mais completo desenvolvido e certamente serviu de inspiração para muitos pesquisadores e empresas de instrumentação científica. A Figura 27 mostra os dois pesquisadores ao lado do sistema cromatográfico que conceberam e utilizaram como principal ferramenta ao longo de suas brilhantes carreiras científicas.



Figura 27 - Stanford Moore e William Stein ao lado de seu sistema cromatográfico em 1965.

Fonte: Instituto Smithsonian.⁷

2.3 “Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia)

A Figura 28 da página 42 apresenta um diagrama com um resumo gráfico dos principais eventos da história da cromatografia, além das fotos dos responsáveis pelas descobertas e/ou invenções.

⁷ Disponível em: <<http://www.si.edu/>>. Acesso em: 2 Nov 2012

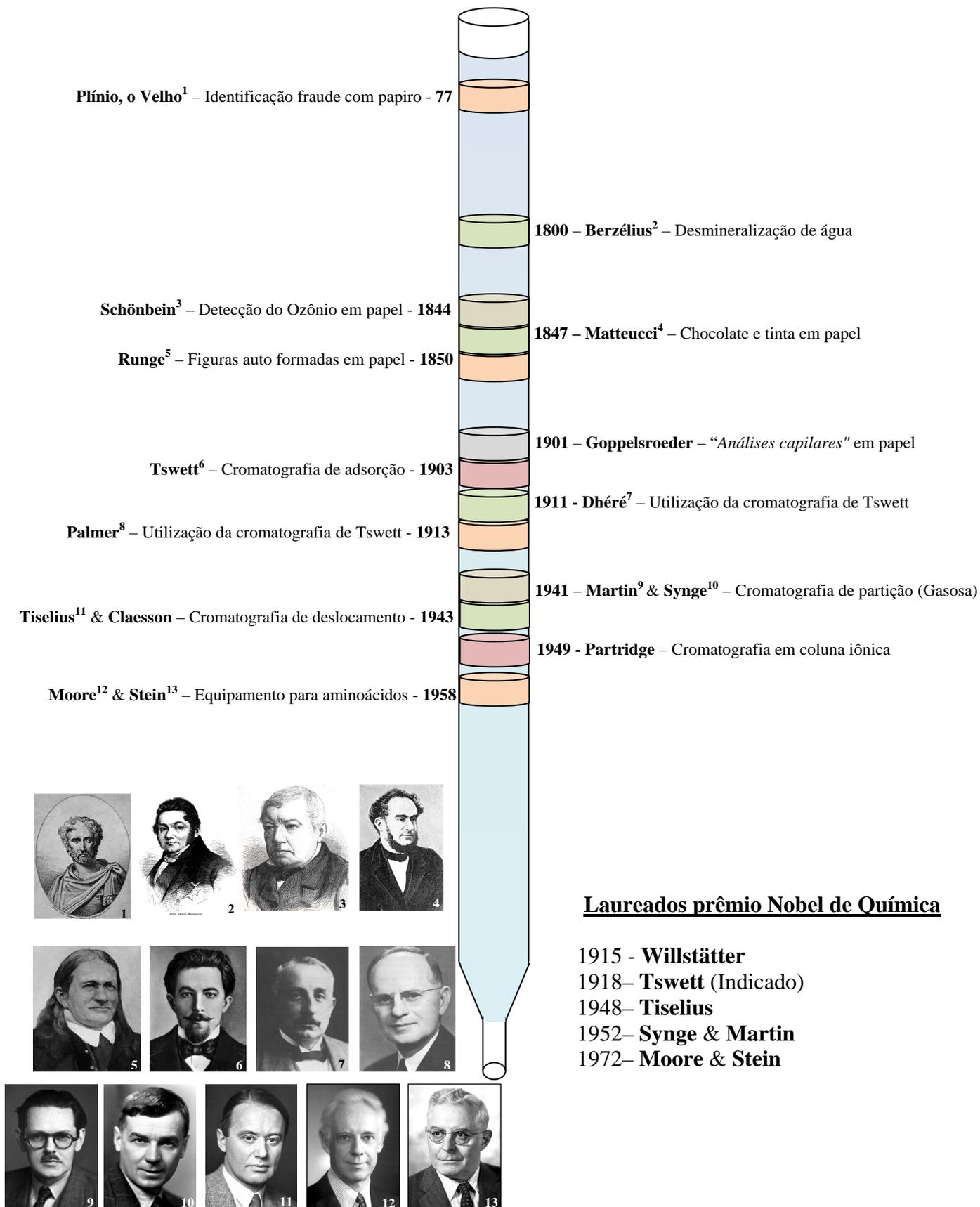


Figura 28 - “Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia).
 Fonte: Diagrama construído pelo autor.

2.4 A instrumentação comercial

No início, os sistemas cromatográficos eram chamados de cromatógrafos líquidos de alta pressão, isto porque os líquidos apresentam viscosidades muito superiores aos gases e, conseqüentemente, altas pressões eram necessárias para mover o líquido através da coluna quando comparado aos cromatógrafos gasosos. Logo, o termo pressão foi substituído por eficiência, e até os dias de hoje é utilizado (ENGELHARDT, 2004).

Como a instrumentação não existia comercialmente em 1968, vários autores descreveram em detalhes como modificar e montar um equipamento de cromatografia líquida com componentes disponíveis. Em 1969, durante o 5º Simpósio sobre avanços em cromatografia, uma sessão especial sobre CLAE foi organizada e algumas companhias apresentaram suas instrumentações. Em 1971, um encontro sobre CLAE foi organizado em Wilmington nos Estados Unidos, deste surgiu o primeiro livro sobre CLAE (ENGELHARDT, 2004).

Como os preços dos sistemas cromatográficos em fase líquida eram muito superiores aos dos já difundidos cromatógrafos em fase gasosa, era comum usuários referirem-se à sigla em inglês “HPLC” como sendo “High **P**rice Liquid Chromatography”, em alusão ao nome que mudara de “**P**ressure” para “**P**erformance”, mudança que ainda era motivo de discussão e confusão. Mais tarde, com a difusão dos sistemas cromatográficos, a discussão tomou rumos de anedota, não era incomum ouvir que a palavra correta para a letra “**P**” da sigla era “**P**atience”. O que pode ser explicado pela dificuldade de adaptação dos usuários de cromatógrafos gasosos, que ao iniciarem com os novos sistemas de CLAE deparavam-se com vazamentos de solventes, bolhas de ar, e com o fato da fase móvel agora não ser mais inerte, interferindo ativamente na separação das substâncias. Não bastasse, ainda existia a necessidade de um sistema de bombeamento do solvente através da coluna, o que não existe em cromatógrafos gasosos pelo fato da fase gasosa apresentar-se pressurizada em cilindros. A adaptação exigia muita dedicação e, certamente, muita paciência dos usuários.

2.5 A evolução das fases estacionárias para cromatografia líquida

Com o início da utilização dos sistemas cromatográficos de alta pressão, nos anos de 1960, eram utilizadas como fases estacionárias partículas de sílica porosa irregulares e com grande distribuição de tamanho, variando na faixa de 40 a 50µm. As separações nestas condições foi chamada de cromatografia em fase normal. Tais partículas de sílica eram então obtidas através de técnicas de moagem e separação em peneiras. Com o passar dos anos a técnica de preparo das partículas foi evoluindo de modo que foram disponibilizadas partículas na faixa de 30 a 40µm, em seguida surgiram as de 15 a 20µm e por fim as de 10 a 3µm, que eram então preparadas com a precipitação da sílica a partir de uma solução de silicato (MALDANER *et al.*, 2010).

No final da década de 1960 foram desenvolvidas as partículas de sílica superficialmente porosa, com aproximadamente 40µm de tamanho eram denominadas partículas peliculares. Tais partículas consistiam de um núcleo sólido não poroso revestido com uma camada de 1µm de sílica porosa. O intuito dos desenvolvedores era reduzir a dispersão dos analitos ao longo da matriz porosa da fase estacionária, com isso, incrementava-se a resolução cromatográfica (KIRKLAND e DESTEFANO, 1970; MALDANER *et al.*, 2010).

Na tentativa de ampliar a aplicação analítica das fases estacionárias, na década de 1970 partículas de sílica foram revestidas com fina camada ativa em sistemas de partição líquido-líquido, no entanto, sérios problemas de estabilidade das fases assim construídas não permitiram a disseminação da técnica. Este método era usado com sucesso em colunas para

cromatografia gasosa, onde líquidos de alta viscosidade eram depositados sobre um suporte inerte. O problema é que esta tecnologia não funcionou bem para colunas de cromatografia líquida, o fluxo da fase móvel acabava dissolvendo a fase estacionária alterando sua concentração no suporte, conseqüentemente as separações apresentavam sérios problemas de reprodutibilidade (ENGELHARDT, 2004; FARIA *et al.*, 2009).

Caíram em desuso também, após o surgimento no mercado de partículas esféricas porosas de 10 e 5 μ m, as partículas peliculares (MALDANER *et al.*, 2010).

A disponibilidade de partículas de sílica esféricas de aproximadamente 10 μ m e o surgimento da técnica de modificação química das fases estacionárias, em especial as fases octadecilsilano (C₁₈) e octil (C₈), permitiram a construção de colunas robustas e de grande seletividade, denominadas de colunas de fase reversa, haja visto a inversão da polaridade da partícula de sílica. Era possível a injeção em meio aquoso, tendo apenas a limitação do uso de bases fortes. A evolução das fases estacionárias foi contínua e rápida, a normalização da superfície da sílica, o uso de sílica de alta pureza, a evolução das modificações químicas e procedimentos de recobrimento dos sítios polares remanescentes produziram sistemas de fase reversa muito robustos, com excelente estabilidade e eficiência. A introdução de outros grupos funcionais ligados aumentou exponencialmente as aplicações e a popularização dos sistemas de separação. Surgiram as fases estacionárias quimicamente ligadas polares, de troca iônica, quirais, entre outras (KIRKLAND e DESTEFANO, 1970; ENGELHARDT, 2004; MALDANER *et al.*, 2010).

Em 1975, a tecnologia de empacotamento das fases estacionárias e a redução do tamanho da partícula (5 μ m) aumentaram a eficiências das colunas. Em 1978, as partículas chegaram a 3 μ m e a 1,5 μ m em 1990. Com tais partículas foi possível chegar aos pratos teóricos necessários para as separações com colunas muito menores, aumentando assim a velocidade e a sensibilidade das análises. No início, as colunas tinham o tamanho padrão de 25 centímetros, onde se conseguia de 8.000 a 10.000 pratos teóricos por metro de coluna. Com as colunas de 3 μ m, o mesmo número de pratos teóricos era alcançado com colunas de 6 centímetros de comprimento, o que reduziu o tempo de análise em um fator de aproximadamente 4 (ENGELHARDT, 2004).

A evolução dos equipamentos e a demanda da indústria, em especial a química e farmacêutica, de controle de qualidade cada dia mais exigente, levou os sistemas cromatográficos CLAE a se tornarem a terceira maior força, em presença nos laboratórios, perdendo apenas para balanças e pHmetros (ENGELHARDT, 2004).

2.5.1 Colunas com partículas superficialmente porosas (*coreshell*)

As partículas superficialmente porosas, ou partículas de núcleo fundido (*Fused Core*), são baseadas nas partículas peliculares desenvolvidas na década de 1960. O seu preparo consiste na sinterização de uma partícula de sílica porosa a alta temperatura, este processo de fusão acaba tornando a partícula livre de poros. Na sequência, o núcleo sólido é revestido com uma fina camada de sílica porosa (Figura 29 página 45) (MALDANER *et al.*, 2010).

As vantagens deste tipo de partícula são a rápida transferência de massa, o que permite análises muito rápidas sem gerar altas pressões e alta resistência mecânica. Seu desempenho é competitivo com as partículas porosas de tamanho inferior a 2 μ m, com a vantagem de gerarem pressões menores. Este tipo de partícula já está disponível comercialmente com diversos tipos de fases e de muitos fornecedores (MALDANER *et al.*, 2010).

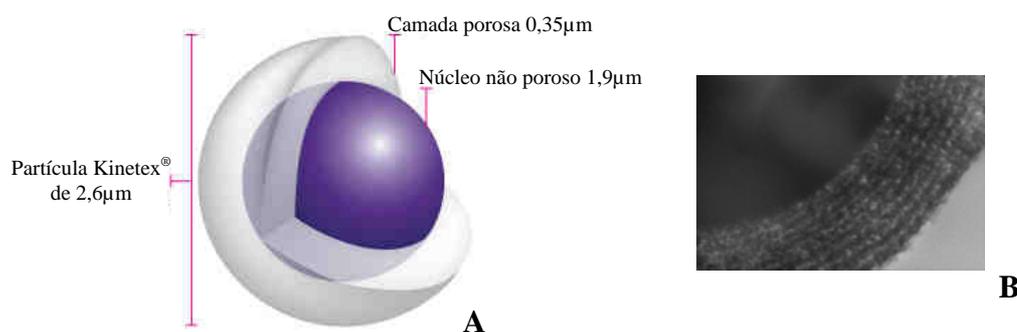


Figura 29 – A- Representação de uma partícula superficialmente porosa, disponível comercialmente com o nome Kinetex® da fabricante Phenomenex®. B- Detalhe microscópico de uma partícula.

Fonte: PHENOMENEX®.⁸

2.5.2 Colunas monolíticas

As colunas monolíticas são construídas com um leito contínuo de sílica porosa no formato de um bastão ou haste. O monolito contém uma distribuição de macro e mesoporos (Figura 30) e podem ser funcionalizadas com as fases comumente utilizadas em cromatografia, como C₈ e C₁₈. A distribuição dos poros torna a coluna permeável, o que permite a utilização de fluxos de fase móvel altos e pressões baixas (MALDANER *et al.*, 2010).

Uma vantagem das colunas monolíticas é que estão menos suscetíveis a entupimentos por acúmulo de partículas, justamente pelo tamanho maior dos poros. No entanto, a utilização de fluxos altos de fase móvel, até 4mL/min, apesar de incrementar bastante a resolução cromatográfica tem por consequência alto consumo de solventes e geração de resíduos. Alguns sistemas cromatográficos ainda apresentam problemas de reprodutibilidade, já que são desenvolvidos para trabalhar sob altas pressões e a coluna monolítica gera pressões muito baixas.

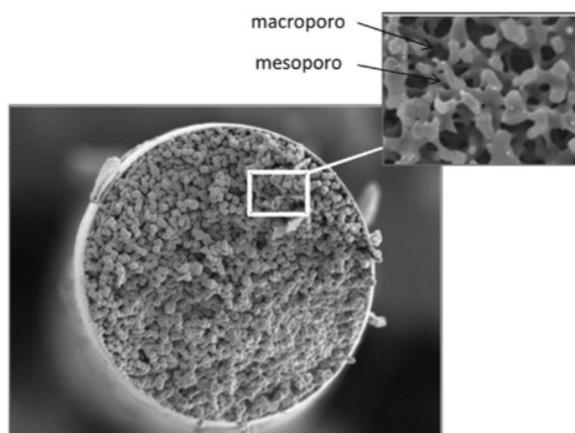


Figura 30 – Corte transversal de um bastão monolítico e sua ampliação (MALDANER *et al.*, 2010).

⁸ Disponível em: <<http://www.phenomenex.com>>. Acesso em: 16 Jan 2014.

2.5.3 Coluna de fase reversa C₃₀

A cromatografia em fase reversa é bem conhecida e muito utilizada para a separação dos carotenoides, no entanto, não é muito eficiente na resolução dos isômeros *cis-trans* dessas substâncias. Excelentes resultados na separação dos isômeros são conseguidos utilizando-se fase normal com colunas de hidróxido de cálcio, no entanto, essas colunas não existem comercialmente e sua preparação apresenta sérios problemas de reprodutibilidade. Fases poliméricas reversas C₃₀ foram desenvolvidas e otimizadas para a separação dos carotenoides e seus isômeros (EMENHISER *et al.*, 1995).

Devido ao fato dos carotenoides serem moléculas maiores que a cadeia das fases estacionárias das colunas C₁₈, aproximadamente 30Å contra 21Å (Figura 31), imaginou-se que interações mais extensivas deveriam ocorrer com fases estacionárias com cadeias mais longas. As fases C₃₀ foram preparadas com base neste pressuposto e as separações dos isômeros obtidas foram sensivelmente melhores que nas fases C₁₈ (SANDER *et al.*, 2000).

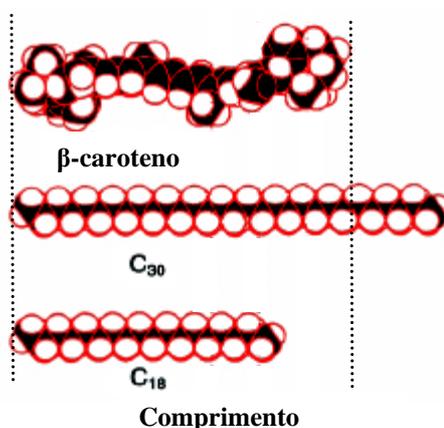


Figura 31 – Comparação do comprimento da molécula de β-caroteno com as fases reversas C₁₈ e C₃₀.

Fonte: YMC[®].⁹

2.5.4 Colunas com partículas inferiores a 2µm

Como já mencionado, na década de 1990 já estavam disponíveis partículas de sílica com 1,5µm. No entanto, colunas montadas com estas partículas, mesmo que curtas, resultavam em pressões bastante elevadas. Os sistemas cromatográficos até então desenvolvidos apresentavam limites de pressão de trabalho entre 4000 e 6000psi, o uso destas partículas para a construção de colunas obrigaria os sistemas cromatográficos a trabalharem nos seus limites, desta maneira, haveria desgaste acelerado de seus componentes, principalmente selos dos pistões e bombas, assim sendo, a utilização deste tamanho de partícula foi desencorajado.

Outro grande entrave no uso de coluna com partículas desse tamanho está nos sistemas de detecção, os picos produzidos em corridas cromatográficas nessas colunas geralmente são extremamente finos, com base podendo chegar a apenas 0,1 segundo de largura. Picos tão finos não são detectados corretamente pela maioria dos detectores comumente existentes, com exceção do detector de massas de tempo de voo (TOF) (WU *et al.*, 2000).

Na primeira década dos anos 2000, a companhia Waters lançou no mercado o primeiro sistema cromatográfico comercial para trabalhar com pressão elevada, o cromatógrafo líquido

⁹ Disponível em: <http://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_carotenoid/>. Acesso em: 16 Jan 2014.

de ultra eficiência (CLUE), comercialmente batizado de ACQUITY®. O equipamento foi desenvolvido para trabalhar em pressões acima de 15000psi, foram ainda desenvolvidos detectores capazes de monitorar corridas cromatográficas com picos estreitos. As principais vantagens do sistema, em comparação com os sistemas CLAE, são as corridas cromatográficas em geral cinco vezes mais rápidas além de um ganho de 2 a 3 vezes de sensibilidade. O ganho de resolução ainda traz outro grande benefício, a diminuição do efeito matriz das amostras, pois os interferentes são melhores separados dos analitos de interesse, dessa maneira, as rotinas de extração e limpeza da amostra podem ser simplificadas ou até mesmo há a possibilidade de se trabalhar com amostras integrais (HOUGHTON e GRACE).

Em aplicações onde a rotina analítica é grande, os ganhos da introdução de sistemas CLUE é inquestionável, pois otimiza os dois grandes gargalos analíticos, o tempo de corrida cromatográfica e o preparo da amostra. No entanto, os métodos cromatográficos devem ser modificados e, evidentemente, os sistemas adquiridos.

Diversos fabricantes apresentaram seus sistemas de ultra eficiência e muitos desenvolvedores de fases estacionárias as suas versões de colunas sub 2µm. Alguns colocaram no mercado uma linha de colunas com partículas intermediárias, entre 2 e 3µm, com a proposta que poderiam ser utilizadas tanto em sistemas de CLUE como em CLAE. Esta proposta tornou-se uma excelente opção para usuários de CLAE que não pretendiam investir em novos sistemas cromatográficos e, ainda assim, beneficiar-se com o ganho de resolução, sensibilidade e rapidez nas separações cromatográficas.

2.6 Aplicação da cromatografia líquida na análise de alimentos

2.6.1 A evolução da análise de aminoácidos após Moore e Stein

Até os dias de hoje, a determinação de aminoácidos é uma importante ferramenta para diversas áreas da ciência, como a bioquímica, medicina e a ciência de alimentos. O primeiro aminoácido a ser observado, através de sua cristalização em solução aquosa de extratos vegetais, foi a asparagina em 1802. Mais tarde, em 1806, a asparagina foi isolada e identificada de extratos de aspargos, de onde deriva seu nome (VAUQUELIN e ROBIQUET, 1806; LEA *et al.*, 2007).

No organismo humano talvez existam aproximadamente cinco milhões de proteínas diferentes, seria praticamente impossível o estudo de todas elas, contudo, isso se torna desnecessário porque todas são formadas dos mesmos monômeros, os alfa aminoácidos. São aproximadamente 20 os aminoácidos constituintes que são perfeitamente conhecidos e se repetem em média 100 vezes nas várias proteínas. Os aminoácidos funcionam não só como unidades estruturais para a formação das proteínas, mas também como precursores de uma série de substâncias biologicamente importantes, como hormônios, enzimas, alcaloides, porfirinas e pigmentos, dentre outras. Os aminoácidos são sintetizados por todos os seres vivos, animais e vegetais, no entanto, alguns animais superiores são deficientes na síntese de todos os aminoácidos de que necessitam para constituir suas proteínas, por isso devem obtê-los em sua dieta. Os humanos adultos necessitam de oito aminoácidos denominados essenciais: Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptofano, Treonina, Metionina e Lisina (SOLOMONS, 1992; SGARBIERI, 1996).

A grande maioria dos aminoácidos não apresenta nenhuma característica física ou química que possibilite a sua fácil determinação, especialmente em baixas concentrações, por esta razão se faz necessário usar de artifício que os transforme em estruturas com características facilmente detectáveis. O usual é proporcionar uma reação, mais seletiva

quanto possível, com compostos que apresentem grupos cromóforos ou fluoróforos facilmente detectados por espectroscopia de ultravioleta/visível, ou fluorímetros. A este tipo de reação dá-se o nome de derivatização. A primeira derivatização usada com sucesso na análise de aminoácidos por cromatografia foi a reação com ninidrina otimizada por Stein e Moore (Item 2.2.2 página 28). A utilização do método com ninidrina para a análise de alimentos foi adaptada por Schram *et al.* (1953) e permaneceu como método oficial até a década de 1990 (VANDERMEER, 1990).

Em busca de aumento de sensibilidade para a quantificação de amostras em baixas concentrações, foram desenvolvidas novas técnicas de formação de derivados utilizando a detecção fluorimétrica, muito mais sensível, em substituição à detecção espectrofotométrica dos derivados de ninidrina.

2.6.1.1 Derivatização com o-Ftalaldeído (OPA)

Roth (1971), na busca da substituição da ninidrina por um derivatizante fluorescente, apresenta o o-ftalaldeído (OPA) como derivatizante para aminoácidos. A reação ocorria em meio alcalino e na presença de um agente redutor, o 2-mercaptoetanol (Figura 32). A separação dos aminoácidos realizada por Roth era semelhante à usada por Moore e Stein, em coluna de troca iônica. O eluato da coluna coletado era então submetido à reação com OPA e quantificado em fluorímetro. A sensibilidade deste método chegou à ordem de nanomoles (10^{-9} M), a reação ocorria sem a necessidade de aquecimento e a determinação podia ser feita após 5 minutos de reação. No entanto, a prolina e a hidroxiprolina não eram detectadas. Em 1973, Roth apresenta o esquema de seu aparato cromatográfico para separação e derivatização automática de aminoácidos com a reação com OPA (ROTH e HAMPÁI, 1973).

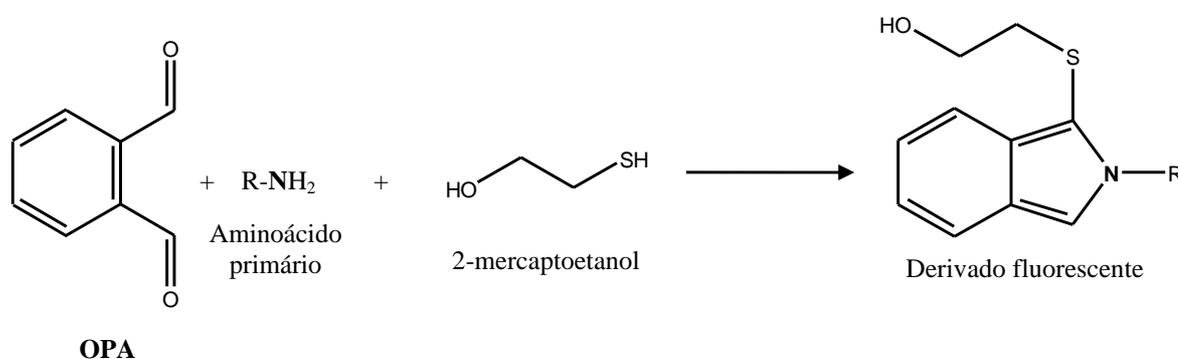


Figura 32 – Reação do o-ftalaldeído (OPA) com aminoácido primário.

Fonte: CUNICO, 1985, p.1.

Lindroth e Mopper (1979) aperfeiçoam os métodos de derivatização pré-coluna com OPA e também o método cromatográfico, agora com separação em fase reversa. Como resultado, estabelecem limite de detecção de 50 femtomol (10^{-15} M) para 25 aminoácidos em corrida cromatográfica de 30 minutos.

Cromatógrafos dedicados à análise de aminoácidos surgiram no mercado, a empresa Varian Inc. (EUA), adaptou o método de derivatização pré-coluna com OPA em injetor automático que era capaz de fazer a mistura dos reagentes antes da injeção, deste modo, a reação era simplificada e automatizada (JONES *et al.*, 1981; CUNICO, 1985). Outros equipamentos eram baseados na derivatização pós-coluna com a separação dos aminoácidos em colunas de troca iônica. A desvantagem destes sistemas era a necessidade de reatores e bombas extras para os reagentes de derivatização (PFEIFER *et al.*, 1983).

2.6.1.2 Derivatização com Fluorescamina

Weigele *et al.* (1972) ao estudarem um derivado fluorescente de ninidrina formado pela reação com o aminoácido fenilalanina, descobriram o princípio da reação e sugeriram um novo reagente para detecção fluorimétrica para os aminoácidos, a fluorescamina.

A reação com fluorescamina (Figura 33) e o método analítico foram então aprimorados para a detecção em níveis de concentração de picomoles (10^{-12} Mol) de aminoácidos, peptídeos, proteínas e aminas primárias. A separação cromatográfica dos aminoácidos continuava sendo realizada em colunas de troca iônica. No entanto, a derivatização de aminas secundárias com fluorescamina não é simples e o método proposto só se aplicava a aminas primárias (UDENFRIEND *et al.*, 1972).

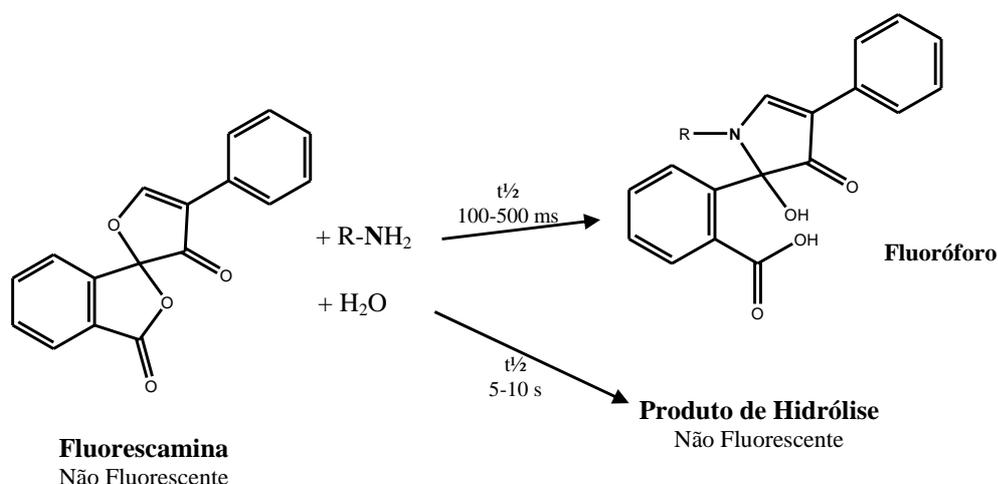


Figura 33 – Reação da Fluorescamina com aminas primárias.

Fonte: UDENFRIEND, 1972, p. 24.

Gruber *et al.* (1976) utilizaram com sucesso a fluorescamina para quantificação de aminoácidos hidrolisados de dois peptídeos de origem biológica. Para tanto, utilizaram detecção fluorimétrica e separação dos derivados em fase reversa, e não mais a separação dos aminoácidos livres (derivatização pré-coluna). Como nota os autores alertam que as colunas comerciais utilizadas sofriam deterioração após alguns meses de utilização.

Benson (1975) publicou uma comparação entre os derivatizantes então desenvolvidos para aminoácidos e conclui que o OPA é o que apresenta maior sensibilidade, cinco vezes mais sensível que a Fluorescamina, e ainda é estável e solúvel em solução aquosa. Desta maneira, o princípio da reação com OPA tornou-se o mais utilizado. No entanto, o OPA ainda não resolvia a questão da análise de aminoácidos não primários.

2.6.1.3 Derivatização com Cloreto de Dansila

Novos reagentes foram surgindo, ou então sendo redescobertos, em busca da maior sensibilidade do método e aplicação aos aminoácidos não resolvidos pelos reagentes até então desenvolvidos. O Cloreto de Dansila (Cloreto de 5-dimetilamino-1-naftaleno sulfonamida) (Figura 34) foi sintetizado e utilizado inicialmente por Weber (1952), para a preparação de derivados fluorescentes de albumina. Seiler (1970) foi o primeiro a apresentar um trabalho completo sobre sua utilização em análises bioquímicas.

Bayer *et al.* (1976) apresentaram o Cloreto de Dansila como uma nova opção para derivatização e análise cromatográfica de aminoácidos. A separação dos derivados era feita em fase reversa com detecção fluorimétrica, o que permitiu limites de detecção cinco vezes menores que os conseguidos com ninidrina.

O cromatógrafo utilizado por Bayer era de construção própria e a reação era pré-coluna. No entanto, a derivatização demorava 1 hora, deveria ser realizada no escuro e em seguida era necessária a remoção do solvente. Aminoácidos primários e secundários eram derivatizados, no entanto os grupamentos amino de aminoácidos heteroaromáticos (histidina e triptofano) não reagem e a lisina formava derivado didansila. Os derivados ainda eram sensíveis a luz e ao ar.

Schmidt *et al.* (1979) aperfeiçoaram o método de modo que o procedimento de derivatização demorava apenas dois minutos em uma temperatura de 100°C, a separação foi realizada em fase reversa C₈ e o tempo de corrida cromatográfica era de 40 minutos.

Apesar das limitações, muitos autores fizeram uso com sucesso da derivatização com cloreto de Dansila para análise cromatográfica de aminoácidos de alimentos até a década de 1990 (KHAYAT *et al.*, 1982; PRIETO *et al.*, 1990).

Novos agentes derivatizantes na mesma linha do cloreto de Dansila foram desenvolvidos, como os cloretos de Bansila e Mansila, no entanto, apresentavam os mesmos inconvenientes do cloreto de Dansila.

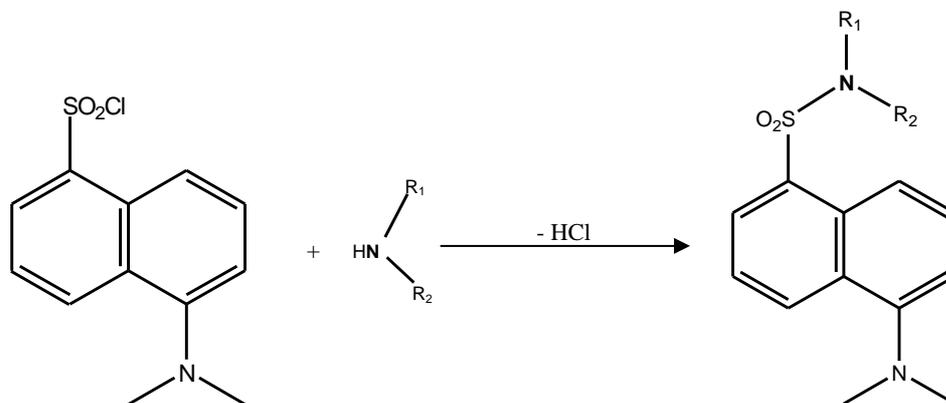


Figura 34 – Reação de derivatização de aminoácidos com Cloreto de Dansila.

2.6.1.4 Derivatização com 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl)

Na década de 1980 surge um novo derivatizante, o 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl). O derivado formado era relativamente estável, desde que sob refrigeração, mas o método apresenta a dificuldade de se fazer necessária a remoção do excesso de reagente via

extração com pentano, o que era trabalhoso e acabava removendo também alguns aminoácidos solúveis em pentano. Gerava ainda múltiplos derivados de um mesmo aminoácido, o que promovia mais de uma resposta cromatográfica para uma mesma substância. A reação (Figura 35) ocorria com aminoácidos primários e secundários, era rápida, 30 segundos, e os derivados formados eram relativamente estáveis (EINARSSON *et al.*, 1983).

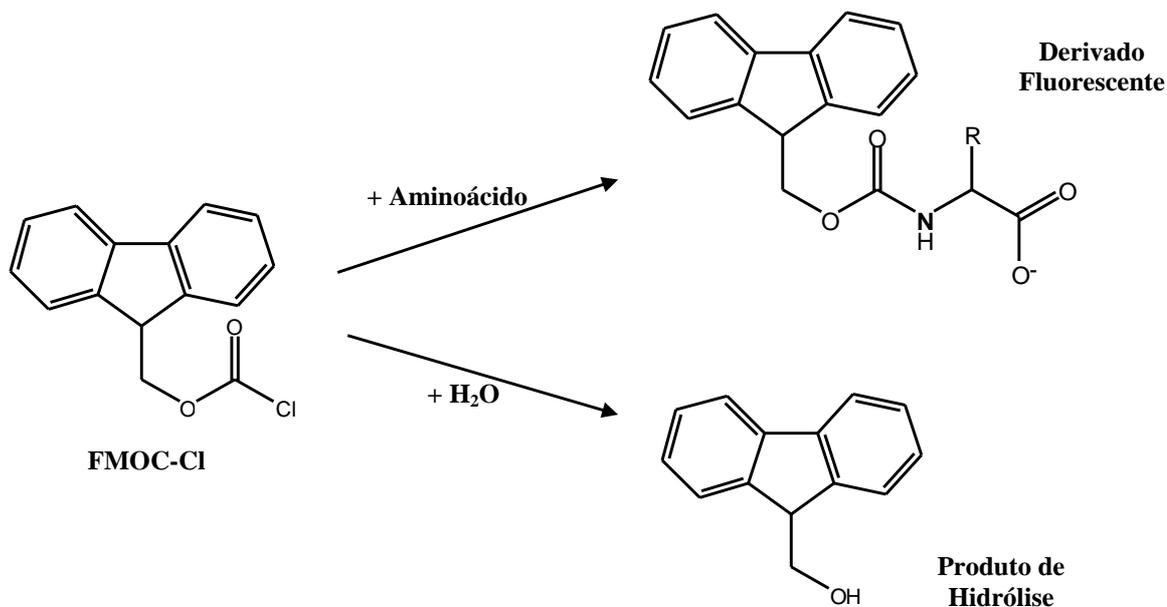


Figura 35 – Reação de FMOC-Cl com aminoácidos.
 Fonte: EINARSSON, 1983, p. 612.

2.6.1.5 Derivatização com Fenilisotiocianato (PITC)

A reação conhecida como Degradação de Edman, foi descrita há muito tempo para a determinação da sequência de aminoácidos de peptídeos (EDMAN *et al.*, 1950). Nela, o grupamento N-terminal do peptídeo sofre clivagem e forma um derivado Feniltiohidantoína (PTH), que pode então ser identificado. O procedimento é então repetido para o próximo grupamento N-terminal, e assim sucessivamente (Figura 36).

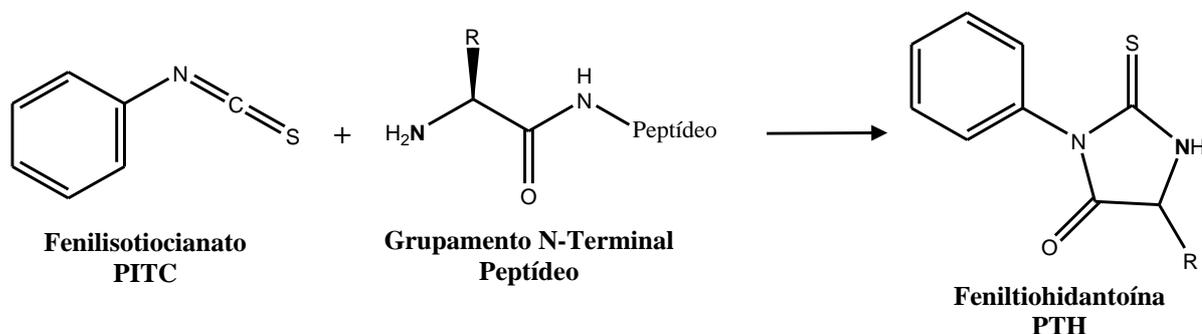


Figura 36 – Degradação de Edman para identificação de aminoácidos.
 Fonte: EDMAN, 1950, p. 283.

A separação dos derivados de aminoácidos Feniltiohidantoínas (PTH) foi realizada anteriormente por cromatografia gasosa, no entanto, haviam muitas limitações, principalmente devido a não determinação de aminoácidos básicos (PISANO *et al.*, 1962).

Ainda no início da década de 1980 surgem os primeiros trabalhos com o derivatizante Fenilisotiocianato (PITC) associado à cromatografia líquida (TARR, 1981; BLACK e COON, 1982; KOOP *et al.*, 1982; HEINRIKSON e MEREDITH, 1984). A reação forma derivados relativamente estáveis da maioria dos aminoácidos primários e secundários, após 20 horas da reação a perda por degradação estimada é de apenas 4%, no entanto, o método é bastante demorado, já que o excesso de PITC deve ser removido por evaporação a fim de evitar contaminação da coluna. Outro problema é a baixa estabilidade de alguns derivados, especialmente do ácido glutâmico e aspártico (BIDLINGMEYER *et al.*, 1984).

A utilização do PITC como derivatizante substituiu no início da década de 1990 a metodologia da AOAC para análise de alimentos, que até então ainda utilizava a derivatização com ninidrina (SARWAR *et al.*, 1988; 1989).

Um *Kit* de derivatização para quantificação de aminoácidos através da reação com PITC foi disponibilizados comercialmente pela *Waters Associates* (EUA), o método foi chamado comercialmente de *Pico-Tag*[®]. A praticidade do seu uso, proporcionada pelo fornecimento de todos os materiais e reagentes, incluindo fases móveis e padrões, fez com que se tornasse bastante difundido (UDOLEN e IFON, 1990).

A eluição dos derivados dos aminoácidos era conseguida em fase reversa com gradiente de acetonitrila, o tempo da corrida cromatográfica era de doze minutos (Figura 37).

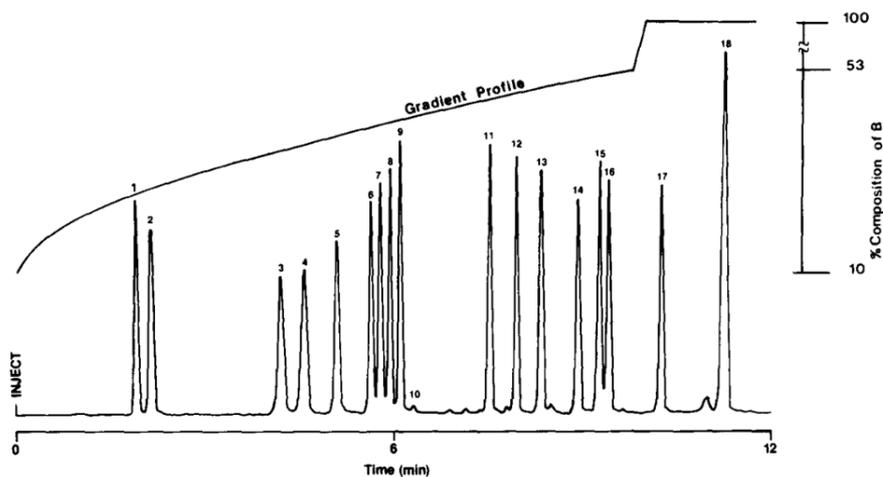


Figura 37 – Cromatograma de derivados de aminoácidos pelo método *Pico-Tag*[®].

Fonte: BIDLINGMEYER, 1984, p.97.

2.6.1.6 Derivatização com 6-aminoquinolil-N-succinimidil carbamato (AQC)

Sintetizado por Cohen e Michaud (1993), o derivatizante 6-aminoquinolil-N-succinimidil carbamato (AQC) foi o substituto do PITC para a derivatização de aminoácidos, reage com aminas primárias e secundárias em poucos segundos formando derivados de ureia bastante estáveis, podendo ser mantidos por até uma semana em solução aquosa e sob temperatura ambiente (Figura 38).

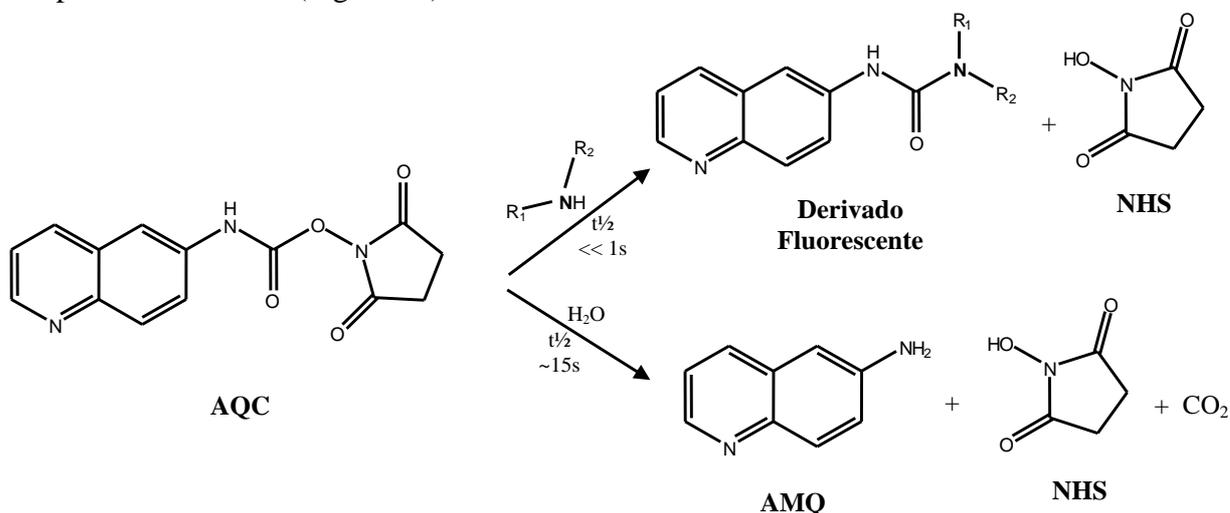


Figura 38 – Reação de AQC com aminoácidos.

Fonte: COHEN, 1993, p. 281.

O processo de derivatização pré-coluna é muito simples e fornece limites de detecção na faixa de 50 a 300 femtomol (10^{-15} M). A hidrólise de apenas cinquenta nanogramas de proteína é suficiente para a análise composicional dos aminoácidos. O excesso de reagente é hidrolisado para 6-aminoquinolina (AMQ) em menos de dois minutos no próprio meio reacional, o que evita reações posteriores indesejadas e etapas de remoção ou extração com solventes. O produto da hidrólise do reagente (AMQ) tem fluorescência em comprimento de onda 100nm distante do derivado AQC-Aminoácido, o que permite a análise sem a preocupação em sua remoção para evitar interferência. A reação ainda é extremamente tolerante a presença de sais e detergentes, diferentemente dos seus antecessores, e a separação dos derivados é feita em fase reversa com detecção por fluorescência em excitação a 250nm e emissão em 395nm. Na comparação entre os derivatizantes PITC e AQC, o AQC se mostrou bastante superior no que diz respeito a estabilidade dos derivados produzidos (STRYDOM e COHEN, 1994).

A separação cromatográfica dos derivados AQC-Aminoácidos é bastante sensível ao pH da fase móvel, à concentração de solvente orgânico e à concentração de sais dissolvidos nas fases móveis, desta maneira, sistemas com bombas quaternárias precisas e o preparo criterioso dos eluentes se fazem fundamentais para a separação e reprodutibilidade do método (VAN WANDELEN e COHEN, 1997). Visando minimizar esses possíveis problemas, a companhia *Waters Associates* (USA) fornece todo o material necessário para a análise na forma de um *Kit* (*Waters AccQ.Fluor reagent*), contendo os padrões, reagentes, diluentes, tampões, fases móveis e a coluna cromatográfica juntamente com material informativo (Figura 39 página 54).



Figura 39 – Kit comercial para derivatização de aminoácidos com AQC (Waters EUA).

Fonte: Foto do autor.

O AQC rapidamente começou a substituir seus antecessores e suas aplicações começaram a aparecer na forma de publicações. Pawlowska *et al.* (1993) mostraram a capacidade do AQC, em conjunto com colunas de ciclodextrina ligadas, em separar enantiômeros de 31 aminoácidos. A aplicação da metodologia se estendeu para a análise de aminoácidos em alimentos, soluções intravenosas e glicoproteínas (COHEN e DE ANTONIS, 1994) e ainda peptídeos sintéticos (DEANTONIS *et al.*, 1994).

Apesar de menos sensível que a detecção por fluorescência, a detecção dos derivados AQC-Aminoácidos pode ser realizada por Ultravioleta, que se mostrou sensível o suficiente para a análise da maioria das amostras rotineiras e demonstra mais uma versatilidade do método (LIU, 1994).

Um estudo mais aprofundado da aplicação do método de derivatização de aminoácidos (pré-coluna) com AQC, sua separação em fase reversa e a sua aplicação na análise de alimentos foi publicado no *Journal of AOAC International*. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos com o uso do método clássico de separação de hidrolisados proteicos em colunas de troca iônica e reação pós-coluna e sugerem várias vantagens na sua utilização sobre os métodos então mais utilizados (LIU *et al.*, 1995).

Aminoácidos livres também podem ser determinados com a utilização de AQC, aplicações na análise do conteúdo de plasma foram desenvolvidas e se mostraram rápidas, simples e necessitam quantidades muito pequenas de amostra (REVERTER *et al.*, 1997; HERESZTYN *et al.*, 2004).

A separação e detecção simultânea de aminoácidos e açúcares aminados com a utilização do AQC foi avaliada por Díaz *et al.* (1996), que atestaram suas vantagens sobre os métodos de derivatização tradicionais, em especial quanto a estabilidade dos derivados e facilidade de condução da reação de derivatização.

Por não reagir apenas com aminoácidos, a versatilidade do uso do AQC abriu campo de pesquisa para diversas classes de substâncias. Derivados também foram obtidos com a reação com grupos hidroxila em meio aquoso, desta maneira, foi possível quantificar álcoois primários e secundários usando derivatização AQC, uma opção à determinação via cromatografia gasosa com *Headspace*, e com os mesmos limites de detecção (MOTTE *et al.*, 1996).

O AQC ainda se mostrou eficiente e prático para a derivatização e análise de amins biogênicas em vinho (BUSTO *et al.*, 1996; MARTÍNEZ *et al.*, 2000) e na determinação dos seus derivados poliaminas (WEISS *et al.*, 1997). Com a análise direta de extratos vegetais, Bouchereau *et al.* (1999) demonstraram a aplicabilidade da reação com AQC na determinação de diversas classes de substâncias de interesse, em especial as poliaminas e betainas. Amins naturais de cadeia longa também formam derivados e podem ser separadas com a metodologia (LESTER e DICKSON, 2001).

(Palace e Phoebe (1997); Palace *et al.* (1999)) demonstraram a utilidade do uso do AQC na detecção de resíduos de aminoácidos em diversas matrizes poliméricas, o que se mostrou viável pela alta sensibilidade do método.

A separação de derivados das micotoxinas fumonisinas B₁ e B₂ foi avaliada por Velázquez *et al.* (2000), que destacam a sensibilidade na resposta e a estabilidade dos derivados fluorescentes obtidos.

2.6.1.7 Derivatização com O-acetato-N-hidroxisuccimidil-fluoreseína (SIFA)

Sintetizado inicialmente para a determinação de catecolaminas (WANG *et al.*, 2000), o O-acetato-N-hidroxisuccimidil-fluoreseína (SIFA) tem algumas vantagens sobre o AQC. Sua síntese é mais simples e usa reagentes mais baratos e facilmente encontrados, além disto, os derivados obtidos (Figura 40) apresentaram fluorescência em faixas de comprimentos de onda onde existem menos interferentes biológicos. Algumas desvantagens, ainda em relação ao AQC, são que o produto de hidrólise do reagente aparece no cromatograma e o tempo de reação é mais longo (WANG *et al.*, 2001).

Considerando o fato de que existe dificuldade em se encontrar o derivatizante AQC, fornecido apenas pela Waters, o SIFA torna-se uma opção.

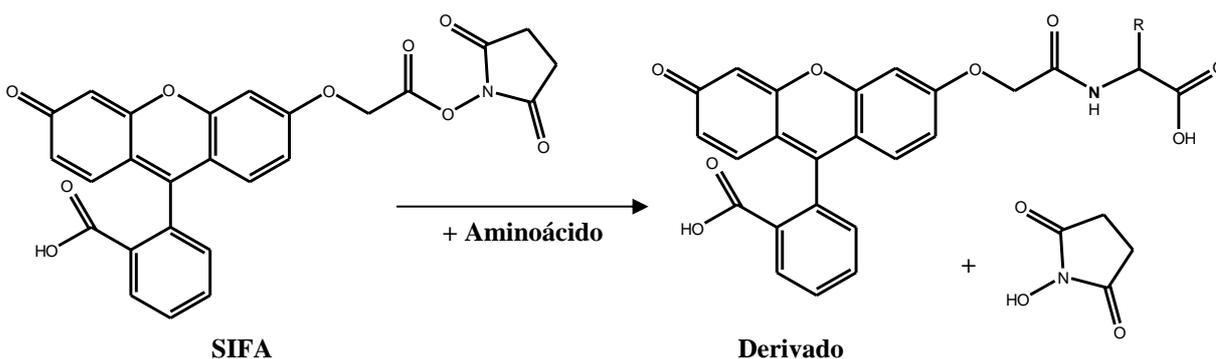


Figura 40 – Reação de aminoácido com o derivatizante SIFA.

Fonte: WANG, 2000, p. 18.

2.6.1.8 Diversificação de métodos analíticos para detecção de aminoácidos

A busca por substâncias alternativas para servir como derivatizantes continua até os dias de hoje, no entanto, até então não surgiram substâncias que trouxessem avanços significativos a técnica. A utilização do AQC, pela sua praticidade e versatilidade, parece ter se tornado o método preferencial na determinação de aminoácidos. Em geral, trabalhos publicados recentemente trazem apenas modificações na técnica de separação e detecção, e não na reação de derivatização (JAWORSKA *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012).

Algumas alternativas de derivatização aparecem para aplicações onde se necessita limites de detecção mais baixos, com a utilização de espectrometria de massas (REBANE *et al.*, 2012; REISCHL e LINDNER, 2012). Separações em sistemas cromatográficos de ultra eficiência tem reduzido o tempo da análise para aproximadamente 10 minutos (ZHANG *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2013).

2.6.2 Métodos de hidrólise de proteínas para análise de aminoácidos

A separação dos aminoácidos de uma proteína classicamente é realizada através da hidrólise das ligações peptídicas, para isso, tradicionalmente utiliza-se a reação com ácido clorídrico a quente, sob refluxo ou em frasco selado (HARFENIST, 1953; HIRS *et al.*, 1954). No entanto, alguns aminoácidos sofrem degradação sob essas condições, o que faz necessário a utilização de múltiplas hidrólises para a correta quantificação dos aminoácidos em proteínas. Os aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, necessitam de uma prévia oxidação para que possam resistir à hidrólise ácida. Por outro lado, o triptofano é sensível a presença de ácido, por esta razão se faz necessária a utilização de uma hidrólise alcalina.

2.6.2.1 Hidrólise ácida

A hidrólise com ácido clorídrico, em geral na concentração de 6N ou aproximadamente 20% (*constant boiling*), é realizada em tubos selados na ausência de oxigênio. São necessárias 24 horas a 110°C para a completa liberação dos aminoácidos, no entanto, existe uma infinidade de modificações neste método visando a redução deste tempo.

Westall e Hesser (1974) aperfeiçoaram as condições da hidrólise ácida de peptídeos de modo que reduziram os tempos de hidrólise para 15 minutos a 160°C ou 2 horas a 130°C. Savoy *et al.* (1975) realizaram extensos testes com a hidrólise ácida em alimentos, os melhores resultados obtidos foram em ampolas seladas com uma razão de 5:1 de ácido para a quantidade de proteína.

Metodologias com a utilização de micro-ondas para realização da hidrólise ácida também foram desenvolvidas, no entanto, são necessários equipamentos e material adequado para este tipo de hidrólise (CHIOU e WANG, 1989; KROLL *et al.*, 1998).

Devido a complexidade da matriz alimentícia, em relação a sua grande variabilidade de composição e a quantidade e tipo de proteína, as condições de hidrólise para a determinação de aminoácidos deveria ser otimizada para cada matriz estudada (ALBIN *et al.*, 2000). No entanto, por razões de praticidade e padronização, o comumente utilizado é a hidrólise com ácido clorídrico a 6N por 24h a 110°C em frascos selados.

A hidrólise ácida é recomendada para a determinação da maioria dos aminoácidos, com exceção dos sulfurados e do triptofano. Pode ser utilizada também para a análise da hidroxiprolina, um aminoácido não essencial exclusivo do colágeno. A quantificação da hidroxiprolina é uma maneira indireta da determinação da quantidade de colágeno, o que pode ser útil na avaliação da maciez de carnes que está relacionada, dentre outros fatores, com o teor de colágeno (KOLAR, 1990; ABREU *et al.*, 2011).

2.6.2.2 Hidrólise alcalina para quantificação do triptofano

São do início dos anos de 1830 os primeiros relatos de derivados coloridos de uma substância obtida de proteínas. Existem relatos desses derivados coloridos reportados por mais de 70 anos, inclusive constatações de que esses derivados apresentavam odor semelhante ao dos compostos derivados do indol. Desta maneira, sem saber a estrutura do composto responsável por esses derivados, Neumeister afirma, em 1890, que este composto obtido da hidrólise de proteínas provavelmente contém um grupo indol em sua estrutura. Foi Neumeister quem batizou a substância como triptofano, oriundo do grego e referindo-se à sua ocorrência em hidrolisados de proteínas obtidos com a enzima tripsina. Hopkins e Cole foram os primeiros a isolar o triptofano (Figura 41 página 57) em 1901 (FRIEDMAN e FINLEY, 1971).

A análise do triptofano foi e ainda tem sido um dos maiores desafios para a química analítica. A primeira razão para isso é devido à grande importância do triptofano, sendo aminoácido essencial para muitos animais, e por participar de inúmeras funções biológicas como, por exemplo, ser precursor da serotonina (Figura 41). A segunda razão consiste na grande dificuldade em manter estável o triptofano proveniente da hidrólise das proteínas (MOLNÁR-PERL, 1997).

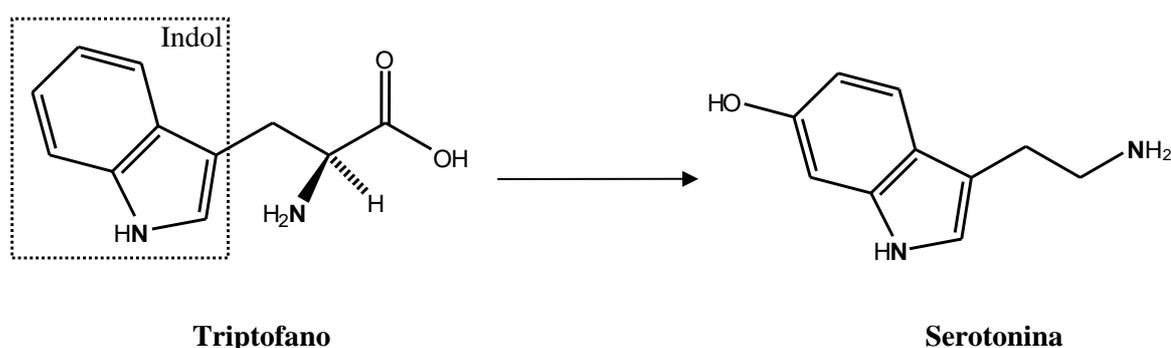


Figura 41 – Molécula do aminoácido triptofano, precursor da serotonina.

A determinação de triptofano livre por espectrometria ou cromatografia líquida é relativamente simples, haja vista que a molécula é facilmente separada por fase reversa e é naturalmente fluorescente, além de ter forte absorção na região do ultravioleta (DEVRIES *et al.*, 1980; MOLNÁR-PERL, 1997).

Já a determinação de triptofano em hidrolisados proteicos é mais trabalhosa, muitos métodos de hidrólise foram testados. Quando se pretende determinar apenas o triptofano, a hidrólise alcalina é sugerida (OELSHLEGEL *et al.*, 1970; HUGLI e MOORE, 1972; SATO *et al.*, 1984). Agentes protetores, como o amido, são sugeridos para aumentar a recuperação (DREZE, 1960). Quando se pretende determinar o triptofano juntamente com os demais aminoácidos, são necessárias hidrólises alternativas, como enzimáticas, com ácidos orgânicos (SIMPSON *et al.*, 1976) e até mesmo com HCl utilizando-se agentes protetores (WONG *et al.*, 1984; MOLNÁR-PERL, 1997). Preferencialmente, a hidrólise deve ser conduzida em frasco inerte fechado e com atmosfera inerte, o que exclui a necessidade do uso de agentes antioxidantes (SPIES e CHAMBERS, 1949).

2.6.2.3 Oxidação com ácido perfórmico para aminoácidos sulfurados

Os aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina (Figura 42 página 58), enquanto ligados à proteína, não podem ser determinadas via hidrólise ácida, pois ambos formam múltiplos derivados além de sofrerem degradação. A solução analítica é promover uma prévia oxidação, ainda enquanto ligadas à proteína, para ácido cistéico e metionina sulfona. A oxidação é realizada com ácido perfórmico a frio, na sequência procede-se a rotina analítica com a hidrólise ácida (MACDONALD *et al.*, 1985; ALLRED e MACDONALD, 1988; TORAN *et al.*, 1996).

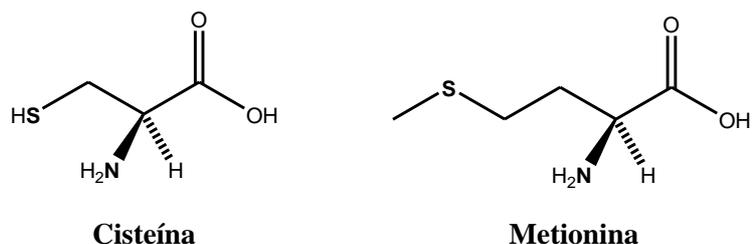


Figura 42 – Moléculas dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina.

Devido a sua instabilidade, o preparo do ácido perfórmico geralmente é realizado *in situ*, para isso utiliza-se a reação de eliminação de água com a mistura de ácido fórmico e peróxido de hidrogênio (Figura 43) (GIBSON, 1969).

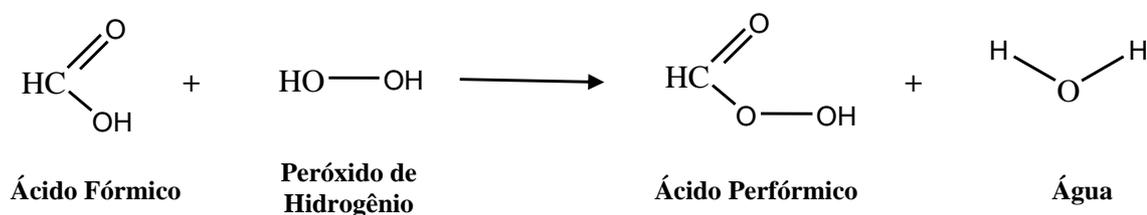


Figura 43 – Preparo do ácido perfórmico.

Fonte: GIBSON, 1969, p. 677.

A utilização da oxidação dos aminoácidos sulfurados de proteínas já havia sido utilizada para a inativação da metionina para estudos com esse aminoácido essencial (TOENNIES, 1942). A aplicação deste método para a análise dos aminoácidos sulfurados por cromatografia líquida foi proposto por Schram *et al.* (1954).

Após o tempo estabelecido para a oxidação dos aminoácidos sulfurados, a reação deve ser interrompida para evitar superoxidação. Para isto, utilizam-se agentes redutores para degradar o excesso de ácido perfórmico, o agente mais comumente utilizado e eficiente é o ácido bromídrico. O bromo gerado nesta reação pode ser facilmente eliminado do meio com aplicação de vácuo (MOORE, 1963).

2.6.3 Carotenoides

Ao estudar os componentes presentes em suco de cenouras, visando a descoberta do componente que dava a essa substância potencial anti-helmíntico, o farmacêutico alemão Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder (1798-1854) acabou por isolar e ganhar o crédito pela descoberta do caroteno (SOURKES, 2009).

O trabalho de Wackenroder consistiu em prensar cenouras para obter um suco alaranjado e turvo. Na sequência, Wackenroder diluiu o suco obtido em água e fez uma extração líquido-líquido com éter. Ao evaporar o éter, obteve um óleo amarelo do qual conseguiu obter o caroteno em pequenos flocos vermelhos. Os cristais eram solúveis em éter, pouco solúveis em álcool e insolúveis em água. Dissolvidos em gorduras, como manteiga, eles produziam uma bela coloração amarela (SOURKES, 2009).

Atualmente mais de 600 carotenoides são conhecidos, sem levar em consideração os isômeros estruturais, divididos em duas grandes classes, os carotenos e as xantofilas.

Dentre os carotenoides, destacam-se os precursores de vitamina A, que são aproximadamente 50 substâncias, os carotenoides com comprovada participação na visão e o licopeno e seus isômeros, com também comprovada ação na redução do risco de câncer de próstata.

2.6.3.1 Carotenoides pró-vitamina A

A vitamina A, ou retinol, é o resultado da clivagem enzimática dos carotenoides pró-vitamínicos. Uma molécula de β -caroteno pode gerar até duas moléculas de retinol, desta maneira, diz-se que apresenta atividade vitamínica de 100%. Todos os demais carotenoides pró-vitamínicos apresentam 50% da atividade do β -caroteno, os principais e mais abundantes são a β -criptoxantina e o α -caroteno. Após sua formação e absorção, o retinol é armazenado no fígado. A isomerização dos carotenoides pró-vitamínicos resulta em perda de sua capacidade vitamínica, por isso a importância na utilização de métodos analíticos capazes de separar os isômeros *cis* e *trans* dos carotenoides.

2.6.3.2 Carotenoides importantes para a visão

A luteína e zeaxantina apresentam importante função na visão, são os carotenoides presentes na mácula da retina. Sua função está relacionada com a proteção das células nervosas responsáveis pela visão das cores, isto se dá através da absorção da radiação azul, de maior energia e conseqüentemente mais danosa. Ao absorver a luz azul espalhada, a mácula ainda aumenta a acuidade visual (PACHECO, 2009).

A luteína é uma xantofila comum em tecidos vegetais, está presente em altas concentrações principalmente associada à clorofila em folhas. A zeaxantina é um carotenoide minoritário em diversas matrizes, sendo o principal carotenoide do milho e do Goji, onde está presente em concentrações bastante elevadas (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011).

2.6.3.3 Licopeno

O licopeno é o carotenoide responsável pela coloração vermelha de muitas frutas, como o tomate, a melancia e a goiaba. Seu consumo está relacionado a redução do risco de alguns tipos de câncer, em especial de próstata. Aproximadamente 80% do teor de licopeno total encontrado na próstata é composto por isômeros *cis*, tendo sido identificados de 14 a 18 diferentes isômeros *cis* neste tecido. No sangue, a concentração de isômeros *cis* representa 50% do total de licopeno. Em alimentos apenas 5 a 10% do total de licopeno encontrado está na forma *cis* (KRINSKY e JOHNSON, 2005).

2.6.3.4 Outros carotenoides de interesse

Alguns carotenoides são exclusivos de certas espécies, é o caso da bixina, exclusivo do urucum (*Bixa orellana*). Outros carotenoides são encontrados minotariamente distribuídos em diversas matrizes, como a zeaxantina, e em alguns casos são raros, como o carotenoide trifasiaxantina, descoberto na espécie *Triphasia tripholia* (YOKOYAMA e BOETTGER, 1970).

O urucum, ou o corante alimentício produzido a partir dele, o colorífico, é o corante natural mais utilizado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo. Dentre seus usos estão a coloração de manteiga, queijos, produtos de panificação, óleos, sorvetes, cereais e embutidos (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

A bixina é o carotenoide majoritário que contém um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades. A norbixina é encontrada em pequenas quantidades nas sementes de urucum, mas pode ser obtida pela hidrólise da bixina (Figura 44).

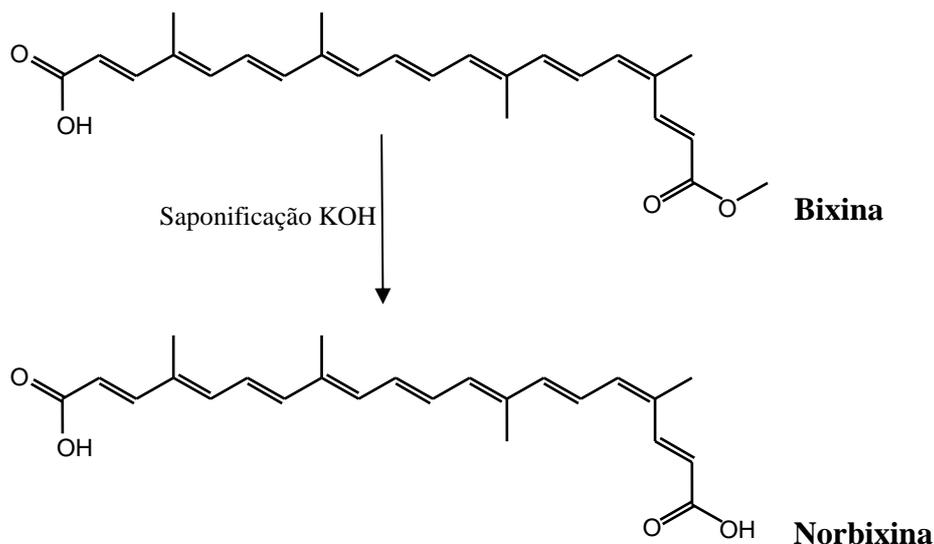


Figura 44 - Os carotenoides bixina e norbixina do urucum.

2.6.4 Substâncias fenólicas

Estudos epidemiológicos ao longo das últimas décadas vêm correlacionando de maneira muito consistente dietas e alimentos específicos com o surgimento de doenças. A identificação de substâncias com reconhecidas atividades benéficas à saúde presentes em alimentos aumenta a cada dia. A busca pelo entendimento dos mecanismos de ação dessas substâncias e o reconhecimento de sua importância na alimentação levaram ao surgimento de termos como “fitoquímicos”, “nutracêuticos” e “alimentos funcionais” (ROBARDS, 2003).

Os termos criados são rapidamente difundidos e em alguns casos são erroneamente utilizados. O exemplo mais claro de uso incorreto de nomenclatura é a utilização de “polifenóis” para designar substâncias fenólicas polihidroxiladas, ou ainda substâncias com o grupamento hidroxila ligado as estruturas aromáticas policíclicas, estas, apesar de serem quimicamente semelhantes aos fenóis (Figura 45 página 61), têm nomenclatura própria, como naftol e fenantrol (SOLOMONS, 1992).

O número e a diversidade das substâncias, divididas em inúmeras classes, são um desafio para a química analítica. Dentre estas classes de substâncias destacam-se os ácidos fenólicos, as isoflavonas e as antocianinas com grande interesse para a ciência dos alimentos.

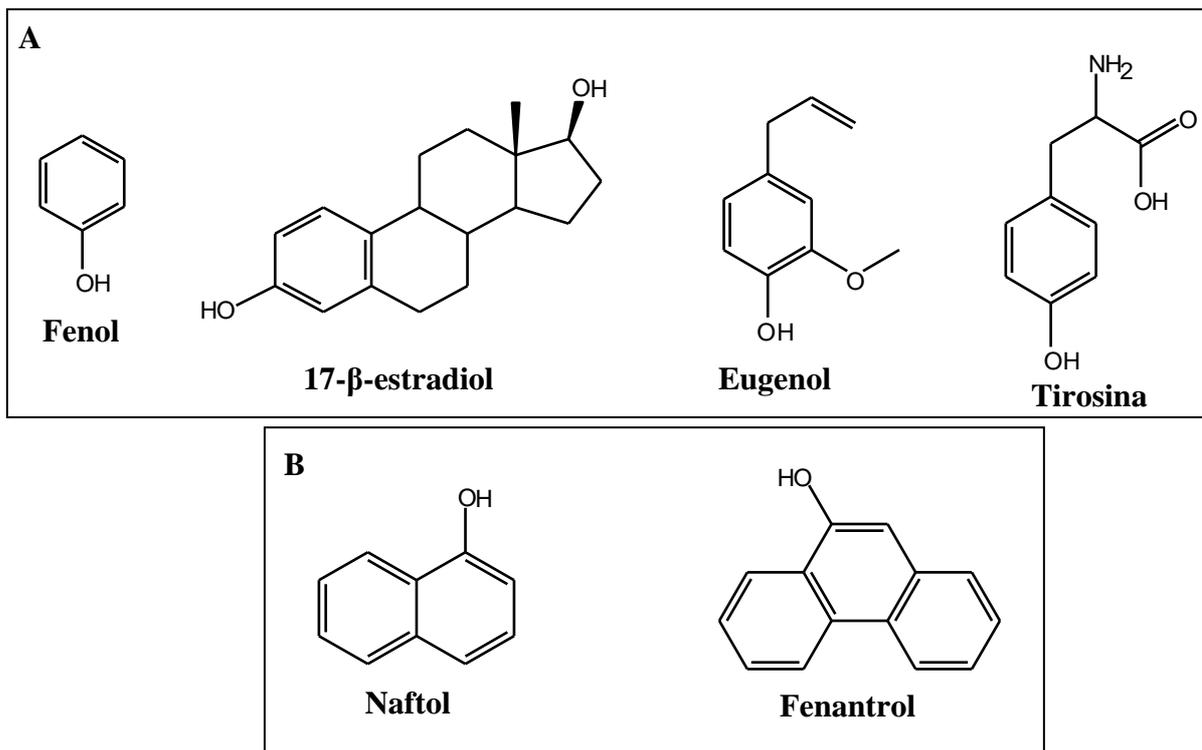


Figura 45 – Exemplos de fenóis (**A**) e de substâncias confundidas com fenóis (**B**).
 Fonte: SOLOMONS, 1992, p. 936-937.

2.6.4.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários de plantas produzidos através da rota biosintética do ácido chiquímico. São derivados hidroxilados do ácido benzoico e do ácido cinâmico (Figura 46). Estudos vêm sendo realizados para determinar sua potencialidade na redução do risco de inúmeras doenças, principalmente doenças cardíacas e câncer. Em alimentos, os ácidos fenólicos geralmente estão presentes na forma de inúmeros ésteres, o que torna sua determinação um desafio para analistas de alimentos. A literatura traz inúmeros métodos de extração e hidrólises para a quantificação dos ácidos fenólicos (MATTILA e KUMPULAINEN, 2002).

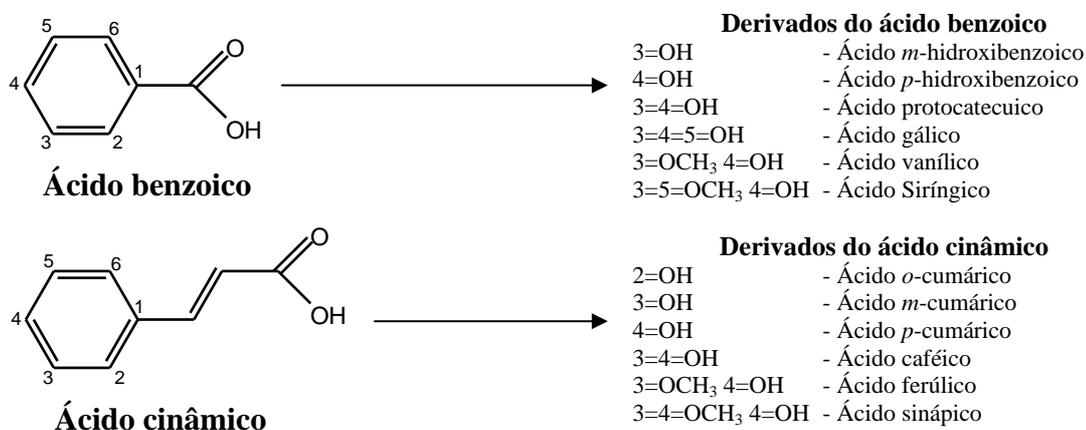


Figura 46 – Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos encontrados em alimentos.
 Fonte: MATTILA, 2002, p. 3660.

2.6.4.2 As isoflavonas

As isoflavonas fazem parte de uma grande classe de substâncias, os flavonoides. São constituídas por três estruturas básicas (Figura 47) e seus derivados glicosídicos, perfazendo um total de doze substâncias. São elas: as agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína; as glicosídicas genistina, daidzina e glicitina; os derivados glicosilados acetilados e os derivados glicosilados malonilados (WALTER, 1941).

Ao isolar os pigmentos da planta *Genista tinctoria*, de onde se extraía um corante amarelo, foi isolada e identificada pela primeira vez a genisteína, cujo nome deriva do nome da planta (PERKIN e NEWBURY, 1899). A gliciteína foi identificada em grão de soja em 1973 (NAIM *et al.*, 1973).



Figura 47 – Estruturas básicas (agliconas) das isoflavonas.

As isoflavonas são conhecidas como fitoesteróis devido a sua semelhança espacial com o estrogênio, em especial na posição das hidroxilas (Figura 48). Esta semelhança sugere uma proteção contra o câncer, em especial os ligados ao estrogênio, como o câncer de mama. A ação se deve pela propriedade das isoflavonas, em especial a genisteína, em ligar-se aos receptores de estrogênio deixando-os indisponíveis para a ação do hormônio (HENDERSON *et al.*, 1982; WANG e MURPHY, 1994; WUTTKE *et al.*, 2007).

Da mesma maneira, a administração de isoflavonas na menopausa pode diminuir os sintomas causados pela falta de estrogênio.

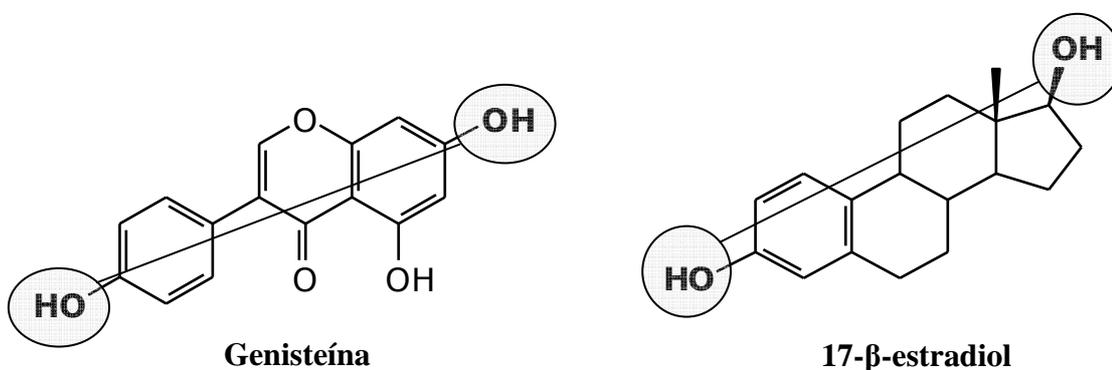


Figura 48 – Semelhança estrutural do hormônio 17-β-estradiol e da isoflavona genisteína.
Fonte: WUTTKE, 2007, p. 153.

As isoflavonas são predominantemente encontradas em leguminosas, em especial no grão de soja. Porém, a distribuição das isoflavonas na semente de soja não é uniforme, estando concentradas no hipocótilo (gérmen) e em concentração moderada no cotilédone (WANG e MURPHY, 1994). A utilização da soja e seus derivados na alimentação humana e animal está de tal maneira difundida que atualmente ela pode ser encontrada em embutidos, carnes, bebidas, suplementos alimentares, rações, entre outras.

A adição de proteína não cárnea, como a proteína da soja, aos produtos de origem animal, pode representar dano ao consumidor e ser configurado como fraude. Por esta razão tem sido motivo de preocupação constante para a fiscalização de alimentos. Embora a soja seja um dos ingredientes vegetais mais utilizados em produtos cárneos, o controle analítico de sua utilização ainda se constitui uma dificuldade (DAGUER *et al.*, 2010).

A separação de isoflavonas por CLAE foi introduzida por West *et al.* (1978), o método veio substituir a análise então realizada por CG.

De modo a simplificar a quantificação das isoflavonas, geralmente o extrato obtido é submetido a uma hidrólise branda com álcali, desta maneira, as formas acetiladas e maloniladas são convertidas nas respectivas formas glicosiladas, que somadas às agliconas resultam em apenas seis estruturas a serem quantificadas (MURPHY *et al.*, 2002).

Já para a conversão das isoflavonas glicosiladas em suas respectivas formas agliconas, se faz necessária uma hidrólise a quente com ácido clorídrico (WANG *et al.*, 1990).

2.6.5 Xantinas

As xantinas são alcaloides derivados de bases púricas, as mais abundantes e com atividades biológicas são as metilxantinas cafeína, a teofilina e a teobromina. Podem causar vários efeitos fisiológicos, como estímulo do sistema nervoso central, aumento da secreção ácida estomacal e diurese (MEYER *et al.*, 1996). Já a hipoxantina é uma xantina de importância por ser o produto final da degradação do ATP (Figura 49).

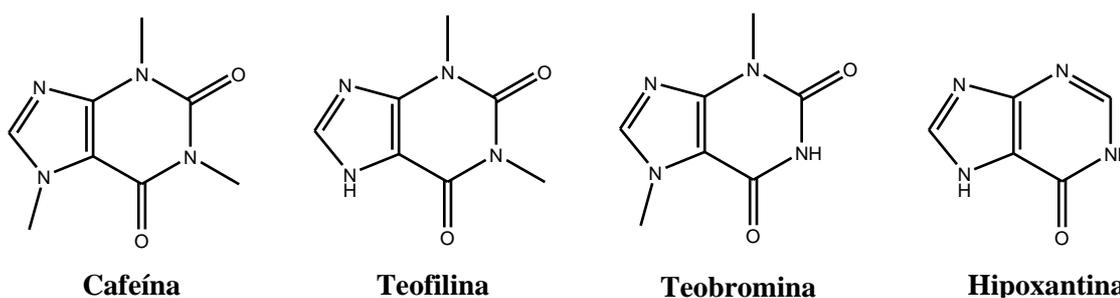


Figura 49 – Estruturas químicas das principais xantinas.

Existem inúmeras técnicas para a determinação das metilxantinas em alimentos, sendo a separação cromatográfica em fase reversa com detecção por UV a mais aplicada (MEYER *et al.*, 1996).

2.6.5.1 A cafeína

Em 1819 o químico alemão F. F. Runge (item 2.1.2 página 4) foi convidado pelo escritor e pensador alemão Goethe para demonstrar o interessante efeito de dilatação da pupila causado pelo extrato de beladona (*Atropa belladonna*). Runge fez a demonstração aplicando o extrato da planta no olho de um gato, Goethe ficou tão impressionado com o resultado que chegou a registrar os resultados em suas anotações (GOETHE *et al.*, 1889). Neste encontro, Goethe deu a Runge uma amostra de grãos de café torrado e sugeriu a ele que os incluíssem em suas pesquisas devido à possível presença de alguma substância com capacidade estimulante. Goethe estava correto, poucos meses depois do encontro Runge foi o primeiro a identificar e isolar a cafeína (RUNGE, FRIEDLIEB FERDINAND, 1866b).

A cafeína é consumida pelo homem ao redor de todo o mundo, pode ser encontrada em alimentos como bolos e chocolates, bebidas como refrigerantes, energéticos, chá e café, tabaco e em diversos medicamentos como analgésicos, inibidores de apetite e estimulantes. O consumo humano global médio diário está estimado em 70mg per capita, podendo chegar a mais de 400mg em alguns países (BARONE e ROBERTS, 1996; CHEN *et al.*, 2002; GARDINALI e ZHAO, 2002). Estudos demonstraram que 2 a 10% da cafeína ingerida é excretada sem modificação na urina, desta maneira, as concentrações de cafeína encontradas em esgotos sanitários pode chegar a 300µg/L (TANGLIU *et al.*, 1983; CHEN *et al.*, 2002). A presença de cafeína em águas ambientais é indicativa da presença de contaminação por esgoto sanitário, e a sua determinação vem sendo usada como marcador para identificar estas fontes de contaminação (IDE *et al.*, 2013).

2.6.5.2 Teofilina e a teobromina

A teobromina é a principal metilxantina encontrada no cacau (*Theobroma cacao*), de onde deriva seu nome. Foi identificada em 1841 pelo químico russo Alexander Voskresensky, que a isolou de sementes de cacau e a diferenciou da cafeína (VOSKRESENSKY, 1842).

A teofilina foi isolada de folhas de chá pela primeira vez pelo bioquímico alemão Albrecht Kossel em 1887, que ainda determinou sua estrutura (JONES, 1953).

2.6.5.3 Hipoxantina e a degradação do ATP

A hipoxantina é uma xantina formada pela degradação do ATP (adenosina trifosfato) em situação de hipóxia (Figura 50), desta maneira tem sido utilizada para a determinação forense da hora de morte. A quantificação da hipoxantina é feita no humor vítreo, líquido presente no interior do olho. O humor vítreo é de fácil coleta, está relativamente protegido contra contaminação, como sangue, bactérias e outras substâncias provenientes da autólise celular pós-morte (SAUGSTAD e OLAISEN, 1978; ROGNUM *et al.*, 1991).

Na qualidade de carnes a hipoxantina também apresenta papel importante, pois após o abate do animal o músculo não morre e se converte em carne imediatamente. O ATP continua fornecendo energia durante um período de tempo para as funções musculares. Em condição de hipóxia, a formação da inosina monofosfato (IMP) e da hipoxantina no músculo intensificam o sabor e o aroma da carne. Desta maneira, os músculos com grandes reservas energéticas (ATP) apresentarão um sabor mais pronunciado (ABREU, 2008).

A concentração de hipoxantina também é utilizada como índice de qualidade de carne de pescado, neste caso, teores elevados desta xantina são indício de degradação e causadores de alterações de sabor (GRAM e HUSS, 1996).

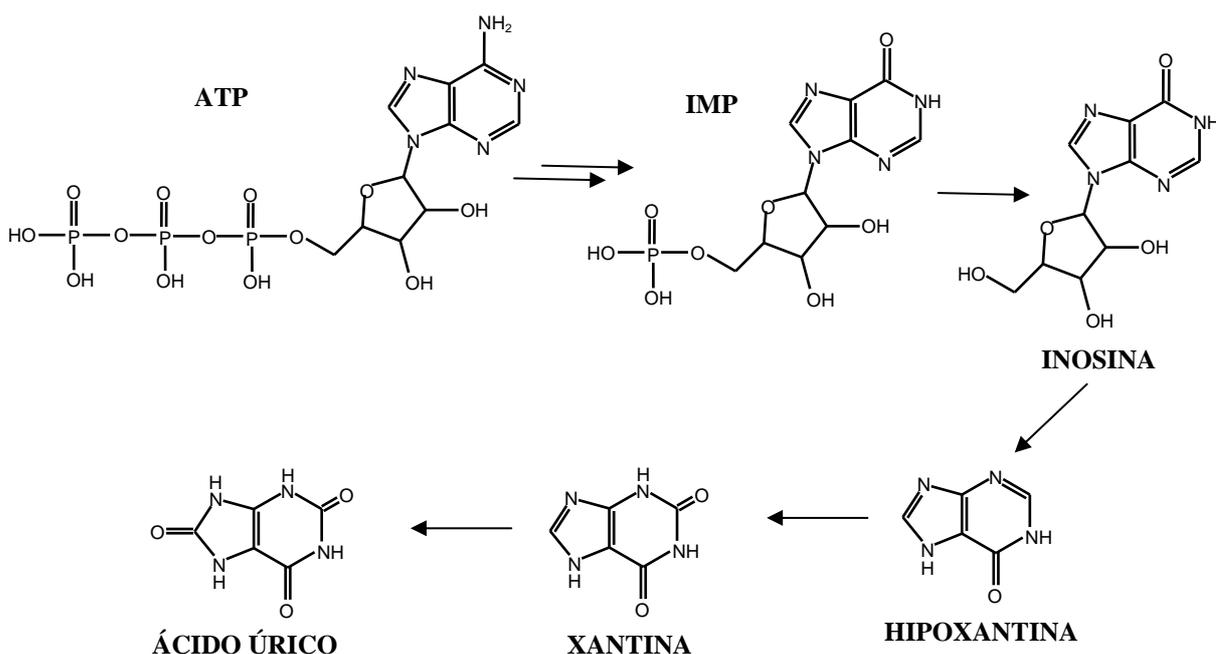


Figura 50 – Reação de degradação do ATP em condições de hipóxia.

Fonte: SAUGSTAD, 1975, p. 159.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Execução da parte experimental

Toda a parte experimental deste trabalho foi executada no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, situado no bairro de Guaratiba no município do Rio de Janeiro.

3.2 Obtenção de padrões analíticos por cromatografia líquida em escala analítica

A utilização da cromatografia líquida em escala analítica na obtenção de substâncias puras para sua utilização como padrões cromatográficos se deu de duas maneiras descritas a seguir:

3.2.1 Coleta manual do efluente da coluna cromatográfica

No isolamento manual da substância de interesse, a coleta se deu após a separação cromatográfica no cromatógrafo analítico, para isso, o efluente do detector foi manualmente coletado utilizando um frasco de vidro (Figura 51). Cuidado foi tomado na coleta de substância lábil, nestes casos os frascos de coleta foram envoltos em papel alumínio, para evitar a exposição à luz, e mantidos em banho de gelo. A coleta se deu através do acompanhamento visual do cromatograma, de modo que o efluente fosse coletado ao iniciar a saída do pico de interesse e fosse interrompida ao término do pico.

Em se tratando de substância com cor, a coleta foi ainda orientada pela coloração do efluente do detector, interrompendo-se a coleta ao não ser mais perceptível a sua coloração (Figura 51).

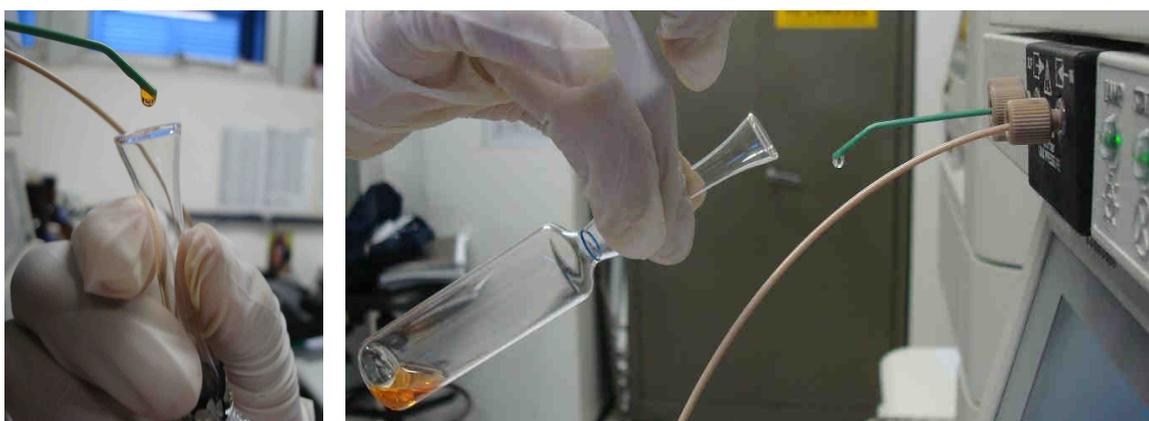


Figura 51 – Coleta manual de um carotenoide na saída do detector do CLAE analítico.
Fonte: Fotos do autor.

3.2.2 Coleta automatizada do efluente da coluna cromatográfica

Para a automação da coleta das substâncias separadas por CLAE foi utilizada uma válvula seletora de 14 portas, modelo RV500-104 (Rheodyne®)¹¹. Esta válvula foi incorporada ao cromatógrafo analítico Alliance™ (Waters) pelo fabricante. Sua função original é permitir a montagem de até seis colunas cromatográficas de modo a possibilitar sua seleção através do *software* de controle do equipamento, permitindo alterações de colunas sem intervenção manual do operador.

A adaptação proposta e realizada consistiu em modificar as conexões de modo que a saída do detector foi adaptada na entrada da válvula, e as saídas da válvula foram destinadas às coletas (Figura 52). Desta maneira foi possível alterar o destino do efluente do detector, possibilitando a seleção e coleta de até cinco substâncias (picos) da corrida cromatográfica. Na prática, o destino do efluente da coluna pôde ser programado, funcionando como um coletor de frações. A saída 1 da válvula foi destinada ao descarte e as numeradas de 2 a 5 para os frascos coletores.

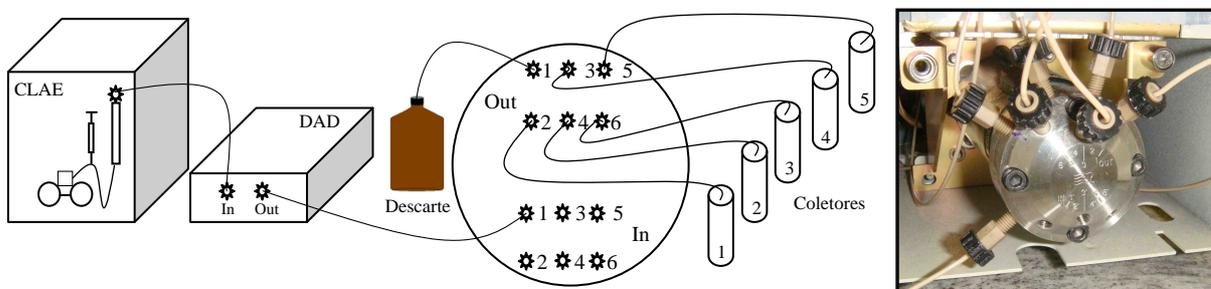


Figura 52 – Esquema e foto da configuração de uma válvula de 14 portas para coleta automatizada do efluente do detector cromatográfico.

Fonte: Esquema e foto do autor.

3.2.3 Metodologia e matrizes utilizadas para isolamento dos padrões

Os extratos para o isolamento dos padrões foram preparados a partir de matrizes conhecidamente ricas na substância de interesse. Foram concentrados ao máximo, por evaporação do solvente, respeitando a capacidade da coluna cromatográfica em separar a substância dos interferentes, a fim de maximizar a quantidade de substância isolada. Com o mesmo propósito, os volumes de injeção foram maximizados e as colunas cromatográficas selecionadas foram as de maior capacidade.

Quando necessário, os extratos foram pré-purificados em colunas abertas, nesses casos os detalhes das fases estacionárias e de eluição utilizados serão detalhados quando pertinente.

3.2.4 Verificação da pureza das substâncias isoladas

A pureza das substâncias isoladas foi determinada através da análise cromatográfica das soluções obtidas nas coletas manuais e automatizadas (PACHECO, 2009). Para ser considerado satisfatório para utilização como padrão cromatográfico, convencionou-se que a substância deveria apresentar pureza mínima de 90%.

¹¹ Descrição detalhada da válvula utilizada pode ser encontrada em: <http://www.rheodyne.com/products/3296/RV.aspx?ProductTypeID=8&ProductFamilyID=2>. Acesso em: 04 Feb 2014.

Para o cálculo da pureza cromatográfica, a integração do cromatograma obtido foi feita no comprimento de onda de absorção máxima da substância de interesse, no entanto, foi feita uma varredura visual ao longo da faixa de comprimento de onda utilizado para verificação da presença de interferentes com absorção em comprimentos de onda diferentes. Desta maneira, não se superestima a pureza do padrão, devido a não visualização de outras substâncias. Com exceção do pico referente ao solvente, todos os picos foram integrados e considerados impurezas.

Cuidado ainda foi tomado de modo a não se analisar soluções diluídas provenientes das soluções isoladas, o que impossibilitaria a integração dos picos de interferentes minoritários resultando em superestimação da pureza cromatográfica.

A área do pico de interesse, em porcentagem relativa à soma das áreas de todos os picos presentes, foi tomada como sendo a pureza cromatográfica do padrão isolado (PACHECO, 2009).

Os espectros de absorção das substâncias isoladas foram adquiridos durante as corridas cromatográficas de verificação de pureza, para isso utilizou-se detector de arranjo de fotodiodos ajustado para varredura na faixa de comprimento de onda de absorção característico da substância isolada.

3.2.5 Quantificação, preparo das soluções padrão e construção das curvas analíticas

Após o isolamento da substância de interesse por CLAE analítico e determinação de sua pureza cromatográfica, obteve-se uma solução com concentração desconhecida desta substância, sendo a fase móvel do método cromatográfico o solvente.

Para o cálculo da concentração da substância, utilizou-se a espectrofotometria (UV-1800, Shimadzu[®]) com a aplicação da lei de *Lambert-beer*. Para isso, a solução da substância isolada teve o solvente removido sob fluxo de nitrogênio, quando em se tratando apenas de solvente orgânico, ou por evaporação em evaporador rotativo (Büchi[®]) seguida de liofilização (L101, Liotop[®]) no caso da presença de água na composição.

Após completa remoção do solvente, a substância foi então solubilizada no solvente adequado para a determinação espectrofotométrica (Tabela 1 página 69). A concentração foi calculada através da equação de *Lambert-beer* (Figura 53) após leitura da absorção desta solução no comprimento de onda específico para a substância isolada, utilizando os valores de sua absorvidade molar (Tabela 1 página 69).

Os valores de concentração obtidos foram então corrigidos de acordo com as purezas previamente determinadas (Item 3.2.4 página 67).

$$\mathbf{A}_{\lambda} = \boldsymbol{\varepsilon}_{\lambda} \cdot \mathbf{c} \cdot \mathbf{l}$$

\mathbf{A}_{λ} = Absorvância da solução no comprimento de onda (λ) e solvente especificado
 $\boldsymbol{\varepsilon}_{\lambda}$ = Absorvidade molar da substância no λ especificado
 \mathbf{c} = Concentração da solução (mol/L)
 \mathbf{l} = Caminho ótico da cubeta (1cm)

Figura 53 – Equação de *Lambert-beer* utilizada para cálculo das concentrações dos padrões.

Tabela 1– Valores de comprimento de onda, absorvidade molar, solvente adequado para cálculo da concentração da substância isolada e matriz utilizada como fonte da substância.

Substância	Solvente	Comprimento de onda (λ em nm)	Absortividade Molar (ϵ_{λ})	Matriz
α -caroteno	Éter de Petróleo	444	2800 ^a	Cenoura
β -caroteno	Éter de Petróleo	450	2592 ^a	Cenoura
<i>cis</i> - β -caroteno	Éter de Petróleo	450	2592 ^a	Alface
β -criptoxantina	Éter de Petróleo	449	2386 ^a	Cajá manga
Licopeno	Éter de Petróleo	470	3450 ^a	Melão-de-São-Caetano
Zeinoxantina	Hexano	445	2636 ^a	Cajá Manga
Retinol	Etanol	323	1780 ^b	Fígado bovino
Daidzina	Metanol	249	26830 ^c	Gérmen de Soja
Glicitina	Metanol	259	26713 ^c	Gérmen de Soja
Genistina	Metanol	263	30895 ^c	Gérmen de Soja
Daidzeína	Metanol	249	31563 ^c	Gérmen de Soja
Gliciteína	Metanol	256	25388 ^c	Gérmen de Soja
Genisteína	Metanol	263	35323 ^c	Gérmen de Soja

Fonte: a-(RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

b-(MERCK&CO, 1983)

c-(MURPHY *et al.*, 2002)

Após a determinação da concentração da substância isolada, esta foi utilizada como solução mãe de padrão para as diluições correspondentes aos pontos da curva analítica do método utilizado. As faixas de trabalho de cada método foram estabelecidas de acordo com os teores do analito nas amostras analisadas.

3.3 Métodos de extração, isolamento e análise de carotenoides

A extração dos carotenoides dos frutos e demais matrizes vegetais foi realizada com acetona seguida por partição em éter de petróleo. Os carotenoides totais foram determinados por espectrofotometria, com leitura em 450nm, e reportados em relação à absorvidade molar do β -caroteno (Tabela 1). Quando necessário procedeu-se a saponificação da solução etérea com solução metanólica de hidróxido de potássio 10% (m/v) no escuro durante 16 horas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Para a quantificação dos carotenoides de polpas de frutas foi utilizado método adaptado de extração e saponificação em escala de microanálise (PACHECO *et al.*, 2014).

A separação cromatográfica foi realizada em coluna cromatográfica YMC[®] C₃₀ Carotenoid (250 x 4,6xmm; 3 μ m) com eluição em modo gradiente de éter metil *terc*-butílico em metanol, conforme Tabela 2 da página 70 (PACHECO, 2009). Em alguns casos específicos foi utilizada eluição em modo isocrático destas fases móveis, os detalhes dessas modificações serão reportados quando pertinente. A detecção foi feita com detector de arranjo de fotodiodos (W2996 Waters[®]) com varredura de 350 a 550nm e quantificação em 450nm.

Dois sistemas cromatográficos foram utilizados, conforme disponibilidade:

Sistema 1 composto por bomba analítica W600 com forno para colunas, degaseificador em linha, injetor automático 717plus (todos da fabricante Waters[®]).

Sistema 2 módulo de separação Alliance[®] 2695 (Waters[®]).

Tabela 2 – Composição do gradiente de eluição para separação de carotenoides.

Tempo em minutos	% Metanol	% éter metil <i>terc</i> -butílico
Inicial	80	20
0,50	75	25
15,00	15	85
15,05	10	90
16,50	10	90
16,55	80	20
28,00	80	20

Fonte: PACHECO, 2009, p. 41.

3.3.1 Isolamento de zeinoxantina e β -criptoxantina

Para o isolamento dos carotenoides zeinoxantina e β -criptoxantina foi utilizado como matriz o fruto de cajá manga (*Spondias dulcis*). Seis frutos maduros foram coletado na área da Embrapa Agroindústria de Alimentos no dia da extração. Os frutos foram descascados e despulpados manualmente e a extração e saponificação dos carotenoides foi realizada a partir de 60g de polpa (item 3.3 página 69). O extrato etéreo obtido foi transferido para balão de fundo redondo de 250mL e levado ao evaporador rotativo (Büchi), o balão foi mantido sob vácuo a 40°C até completa evaporação do solvente. Adicionou-se então ao balão 3mL de acetona, após agitação manual a solução obtida foi transferida para vial âmbar de 4mL.

Alíquotas de 50 μ L do extrato foram injetadas utilizando o método cromatográfico (item 3.3 página 69). O pico referente à zeinoxantina, com tempo de retenção de 11,4 minutos, foi coletado manualmente na saída do injetor.

O volume restante do extrato de polpa de cajá manga, após a coleta da zeinoxantina, foi utilizado para a obtenção do padrão de β -criptoxantina. Previamente à coleta manual da β -criptoxantina, o extrato foi pré-purificada em coluna aberta, preparada do seguinte modo: uma coluna de vidro de 30cm por 3cm de diâmetro (DiogoLab) foi preenchida com 10cm de uma mistura 1:1 (v/v) de óxido de magnésio (Merck) e celite (Tedia), previamente ativada em estufa a 110°C durante 4 horas (PACHECO, 2009).

O solvente do extrato foi removido sob fluxo de nitrogênio e o resíduo dissolvido com 2mL de éter de petróleo. A solução obtida foi aplicada ao topo da coluna aberta, a eluição foi realizada com éter de petróleo até a separação da fase correspondente à β -criptoxantina. Esta foi então removida manualmente da coluna com auxílio de uma espátula metálica, o carotenoide foi extraído do adsorvente com acetona e após filtração o extrato obtido foi concentrado sob fluxo de nitrogênio (White Martins) até volume aproximado de 2mL. A solução concentrada assim obtida foi injetada no método analítico (item 3.3 página 69) para coleta manual da β -criptoxantina.

3.3.2 Isolamento de *cis*-licopeno

Para a formação e o isolamento de um isômero *cis* de licopeno a matriz escolhida foi o fruto do Melão-de-São-Caetano (*Mormodica charantia* L.). Os frutos foram coletados na área da Embrapa Agroindústria de Alimentos e foi preparado um extrato etéreo dos arilos das sementes (item 3.3 página 69).

Para a isomerização do *trans*-licopeno, foi preparada uma coluna aberta com 5cm de sílica (Merck) previamente ativada por 4 horas a 110°C, a eluição foi realizada com hexano (Tedia) acidificado com 0,5% de ácido acético glacial (Tedia).

Após a separação e coleta das bandas formadas com a eluição na coluna aberta, estas foram injetadas no método analítico (item 3.3 página 69) e um dos picos minoritários foi escolhido para a coleta manual.

3.3.3 Isolamento de *cis*- β -caroteno

A matriz escolhida para a obtenção de isômeros *cis* de β -caroteno foi o alface, adquirido no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. A extração foi feita a partir de 20g de folhas frescas maceradas (item 3.3 página 69). A solução etérea obtida foi evaporada sob fluxo de nitrogênio até a secura, ao resíduo foram adicionados 3mL de éter de petróleo (Tedia).

O extrato etéreo foi pré-purificado em uma coluna aberta com 5cm da mistura de celite e óxido de magnésio 1:1 (v/v). A eluição se deu com éter de petróleo, e após a separação visual dos pigmentos, a fase correspondente ao β -caroteno (*cis* + *trans*) foi retirada manualmente da coluna com auxílio de uma espátula metálica. Os carotenoides foram extraídos do adsorvente removido da coluna aberta com acetona (Tedia). O extrato obtido foi concentrado até aproximadamente 2mL sob fluxo de nitrogênio e então transferido para vial para injeção no método cromatográfico analítico (item 3.3 página 69) para a coleta manual do pico referente aos isômeros *cis*- β -caroteno.

3.3.4 Isolamento de α -caroteno e β -caroteno

Para o isolamento do alfa e beta caroteno, a matriz escolhida foi a cenoura. A extração foi realizada a partir de 15g de raízes de cenoura (item 3.3 página 69). O extrato etéreo final teve o solvente removido sob fluxo de nitrogênio até secura e o resíduo foi solubilizado com 2mL de acetona, que foram então transferidos para vial de 4mL. Os picos referentes ao α -caroteno e β -caroteno foram recolhidos manualmente na saída do detector ao eluirem com a utilização do método analítico (item 3.3 página 69).

O solvente das soluções recolhidas foi removido sob fluxo de nitrogênio e o resíduo dissolvido com 10mL de éter de petróleo. As soluções obtidas foram quantificadas por espectrofotometria através da lei de *Lambert-beer* utilizando os valores tabelados de absortividade molar (item 3.2.5 página 68).

Para verificação da pureza cromatográfica, o solvente de uma alíquota de 1mL de cada um dos padrões isolados foi removido sob fluxo de nitrogênio, o resíduo foi então dissolvido com 100 μ L de acetona e a solução injetada no método analítico (item 3.3 página 69).

3.3.5 Novas fontes para isolamento de carotenoides

Na busca por matrizes ricas em diversidade e concentração de carotenoides, muitos frutos foram testados como possível fonte de carotenoides para o isolamento de padrões analíticos. Dentre os frutos estudados, destacaram-se os de cinco espécies coletadas no município do Rio de Janeiro: Melão-de-São-Caetano (*Mormodica charantia* L.) coletado nas coordenadas 23°00'4,5''S 43°35'1,7'', *Clusia major* (22°58'21,6''S 43°23'5,8''W), *Clusia fluminensis* (22°58'12,7''S 43°23'10,9''W), Caferana (*Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC.)

(22°57'50''S 43°23'4''W) com exsicata depositada em herbário sob código RBR35799 e Cereja-da-praia (*Eugenia punicifolia*) (23°2'45''S 43°35'43''W).¹²

Frutos desidratados de Goji (*Lycium barbarum*) foram adquiridos no comércio do município do Rio de Janeiro e analisados para confirmação do teor de zeaxantina reportado na literatura.

3.3.6 Métodos de extração e análise de bixina e norbixina

Para o preparo de padrões dos carotenoides bixina e norbixina foram utilizadas como fonte sementes de urucum, adquiridas no mercado varejista do município do Rio de Janeiro. Para a obtenção do extrato, três gramas de sementes foram previamente desengorduradas com 10mL de éter de petróleo em ultrassom durante 5 minutos. Em seguida foram extraídas em ultrassom durante 5min com 5mL de uma mistura de metanol/diclorometano (1:1 v/v), a solução obtida foi então filtrada em papel de filtro.

O isolamento da bixina foi realizado em coluna aberta. Para isso, uma coluna de vidro de 30cm por 3cm de diâmetro (DiogoLab) foi preenchida com 6cm de sílica previamente ativada em estufa a 110°C durante 4 horas. Foram aplicados 2mL do extrato preparado e a eluição foi realizada com acetato de etila/éter de petróleo (3:2), até eluição da primeira fase (não de interesse). Em seguida, foi utilizada uma mistura de metanol/diclorometano (1:1) até a eluição da fase correspondente à bixina. A solução obtida foi transferida para balão volumétrico de 100mL e avolumado com metanol.

Para o preparo da norbixina realizou-se uma hidrólise da bixina (Figura 44 página 60), para isso, uma alíquota de 50mL da solução de bixina isolada foi transferida para erlenmeyer de 125mL com tampa. Foram então adicionados 50mL de solução de KOH 10% em metanol, o frasco foi tampado e deixado no escuro durante uma noite. Na sequência, foram adicionados 5mL de ácido acético glacial e a mistura foi extraída com diclorometano em funil de separação. O diclorometano foi então transferido e avolumado para balão volumétrico de 100mL.

O método cromatográfico para a análise de bixina e norbixina baseou-se no método de Tocchini e Mercadante (2001), foi utilizado um sistema cromatográfico composto por bomba W600, injetor Wisp 717plus, degaseificador em linha, detector de arranjo de diodos W2996 com varredura entre 300 e 600nm, todos da Waters®. A coluna utilizada também foi da Waters® (C₁₈; 100 x 4,6mm; 3,5µm). A eluição foi em modo isocrático (65:35) de acetonitrila/água acidificada com 2% de ácido acético, o volume de injeção foi de 20µL e o fluxo de 1,0mL/min.

3.4 Métodos de extração e análise de ácidos fenólicos

O método de extração e análise de ácidos fenólicos baseou-se na metodologia descrita por Mattila e Kumpulainen (2002), capaz de quantificar os ácidos fenólicos livres e totais. Modificações na extração foram feitas para adaptar e simplificar a rotina analítica. O método cromatográfico também foi alterado para incrementar a resolução e reduzir o tempo de análise.

A extração consistiu em macerar a amostra em gral de porcelana, em seguida transferiu-se o macerado para frasco âmbar de 40mL e adicionou-se 10mL da solução extratora: metanol contendo 2g/L de BHT e ácido acético 10% (85:15). A mistura foi então agitada e levada ao ultrassom durante 30 minutos. Após decantação, uma alíquota de 100µL foi transferida para redutor de volume para determinação cromatográfica, este procedimento,

¹² A identificação botânica e depósito de exsicata foi gentilmente realizada pelo professor Marcelo da Costa Souza, do Departamento de Botânica da UFRRJ.

antes das hidrólises básica e ácida, permite quantificar os ácidos fenólicos livres presentes na amostra.

Para a realização da hidrólise alcalina adicionou-se 17mL de NaOH 3M, em seguida borbulhou-se N₂ na solução durante 1 minuto para remoção do oxigênio. O frasco foi então tampado e mantido sob agitação mecânica por 16h. O sobrenadante do frasco foi transferido para béquer de 100mL e adicionou-se 7mL de HCl 6M, após agitação o pH da solução foi ajustado em pHmetro (Bel[®]) para 2,0±0,1 com HCl 6M. O extrato foi transferido para funil de separação de 500mL onde efetuou-se extração líquido-líquido com 3 alíquotas de 15mL de Éter Etílico / Acetato de Etila (1:1). Os extratos foram então combinados e avolumados para 50mL. Uma alíquota de 1mL foi então levada a secura sob fluxo de N₂, o resíduo foi dissolvido com 100µL de metanol e a solução obtida levada para análise cromatográfica.

Para a realização da hidrólise ácida a fase aquosa do funil de separação foi novamente transferida ao frasco original contendo o resíduo sólido da extração. Adicionou-se 2,5mL de HCl concentrado (36%), tampou-se o frasco que foi mantido em estufa à 85°C durante 35 minutos. Após o resfriamento o sobrenadante foi transferido para béquer de 100mL, adicionou-se 5mL de NaOH 3M e ajustou-se novamente o pH para 2,0±0,1 com NaOH 3M. Nova extração, evaporação e análise cromatográfica foram realizadas conforme descrito anteriormente na hidrólise alcalina.

Após a quantificação cromatográfica os resultados obtidos para as duas hidrólises foram somados para obter o teor de ácidos fenólicos totais da amostra.

O método cromatográfico descrito por Mattila e Kumpulainen (2002) foi adaptado para a coluna Thermo[®] (BDS Hypersil C₁₈; 4,6 x 100mm; 2,4µm). Após as melhorias propostas, o método final consistiu em eluição gradiente da fase móvel **A** (água acidificada com 1,5mL/L de ácido fosfórico) e da fase móvel **B** (acetonitrila) com fluxo variando de 1,0 a 1,2mL/min (Tabela 3). A coluna cromatográfica foi mantida a 30°C e o volume de injeção foi de 10µL. A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos (2996, Waters[®]) com varredura entre 210 e 400nm.

Tabela 3 – Composição do gradiente de eluição para separação de ácidos fenólicos.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
Inicial	1,0	95	5
6,0	1,0	95	5
12,0	1,2	88	12
18,0	1,2	80	20
20,0	1,2	50	50
24,0	1,2	50	50
25,0	1,2	95	5
28,0	1,0	95	5

Fase **A**: Solução de ácido fosfórico 1,5mL/L e Fase **B**: Acetonitrila.

Fonte: Tabela do autor.¹³

Para o desenvolvimento do método cromatográfico e construção das curvas analíticas foram utilizados os seguintes ácidos fenólicos disponíveis comercialmente (Sigma Aldrich[®]): gálico, vanílico, clorogênico, caféico, siríngico, orto-cumárico, p-cumárico, ferúlico e sinápico. Soluções estoques dos padrões foram preparadas individualmente, na concentração de 2mg/mL em metanol. As soluções de calibração foram feitas com misturas dos padrões de

¹³ Gradiente de eluição modificado pelo autor a partir do método descrito por Mattila e Kumpulainen (2002).

modo a obter nove pontos de calibração com faixa de concentração variando entre 100 e 2.200µg/mL.

A matriz escolhida para avaliar o método implantado foi pó de café (*Coffea arabica* L.) torrado e moído, adquirido no comércio varejista do município do Rio de Janeiro.

3.5 Extração, hidrólise, isolamento e análise de isoflavonas em soja

Para o preparo dos padrões de isoflavonas foram utilizados como fonte grãos de soja, que foram adquiridos no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. A extração das isoflavonas, tanto para as análises quanto para o preparo dos padrões, consistiu em extração com uma solução metanol:água (80:20) por duas horas à 65°C e posterior saponificação branda com solução de hidróxido de sódio (KLUMP *et al.*, 2001).

Para o descasque e separação das partes do grão de soja (casca, cotilédone e gérmen), utilizou-se a metodologia otimizada por Felberg e Cabral (2001). O prévio desengraxe das amostras foi realizado através de agitação com hexano (Ultra Turrax T18, IKA®), seguida de filtração em funil de vidro com placa sinterizada (GODOY *et al.*, 2005).

Para a conversão das formas glicosiladas das isoflavonas em agliconas, procedeu-se hidrólise ácida (HCl 1M) do extrato em refluxo por uma hora a 90°C (WANG *et al.*, 1990).

As separações cromatográficas foram realizadas segundo Klump *et al.* (2001) em um sistema cromatográfico Alliance® 2695 (Waters®). Foi utilizado detector de arranjo de diodos (W2996 Waters®), ajustado para varredura de 200 a 400nm com quantificação em 260nm. A coluna cromatográfica utilizada foi uma YMC® ODS-AM S-5µm (4,6 x 250mm; 5µm) sob temperatura de 45°C. O volume de injeção foi 25µL e a eluição em modo gradiente (Tabela 4) das fases **A**-água:metanol:ácido acético (88:10:2 v/v) e **B**-metanol:ácido acético (98:2 v/v).

Para as coletas das isoflavonas utilizou-se o procedimento automatizado, conforme descrito no item 3.2.2 da página 67.

Tabela 4 – Composição do gradiente de eluição para separação de isoflavonas.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
Inicial	90	10
0,1	90	10
30,0	40	60
31,0	40	60
31,5	0	100
37,0	0	100
37,5	90	10
45,0	90	10

Fase **A**: Água:Metanol:Ácido acético (88:10:2 v/v) e Fase **B**: Metanol:Ácido acético (98:2 v/v).

Fonte: KLUMP, 2001, p. 1883.

3.5.1 Aplicação do método para detecção de fraude por adição de soja em carnes

A aplicabilidade do método analítico de isoflavonas para a detecção de adição de soja em carnes foi avaliada. Para isso, utilizaram-se amostras de lombo suíno. Foram preparadas peças de lombo com injeção de salmoura e soja nas seguintes proporções: 1- lombo não injetado (*in natura*); 2- água e 0,75% de sal; 3- água, 0,75% de sal e 1,5% de proteína isolada

de soja. Após a injeção, os lombos foram embalados a vácuo e mantidos sob refrigeração até o processamento (DAGUER *et al.*, 2010).

Para a extração das isoflavonas, as amostras de lombo foram trituradas em multiprocessador de alimentos e em seguida liofilizadas. Após a liofilização, foram novamente trituradas (Moinho A11, IKA[®]), embaladas e armazenadas em dessecador (DAGUER *et al.*, 2010). As extrações foram realizadas conforme item 3.5 da página 74.

3.5.2 Implantação de método rápido para análise de isoflavonas por CLAE

Um novo método cromatográfico de análise de isoflavonas foi desenvolvido. Foi avaliada a capacidade de separação das isoflavonas em uma coluna com partícula menor que a da coluna do método original. A coluna testada foi a Phenomenex Kinetex[®] (50 x 2,1mm; 2,6µm). A fase móvel foi a mesma utilizada no método convencional (item 3.5 página 74).

3.6 Extração, isolamento e análise de retinol

Para o isolamento do retinol, a matriz escolhida como fonte foi o fígado bovino. Para a extração e saponificação, 15g de fígado bovino foram macerados em gral de porcelana e transferidos para erlenmeyer de 250mL. Ao macerado foram então adicionados 50mL de uma solução de hidróxido de potássio/pirogalol/metanol 20:1:79 (m/m/v). A mistura foi deixada durante 3h ao abrigo da luz, transferida para funil de separação de 500mL e extraída com 100mL de solução de éter de petróleo/éter etílico 20:80 (v/v), dividido em duas etapas. A fase etérea foi lavada com água MilliQ[®] até pH neutro, verificado com tira indicadora (Merck[®]). O extrato etéreo foi então evaporado em evaporador rotativo até *secura*, o resíduo foi dissolvido com 5mL de etanol absoluto e a solução filtrada em membrana 0,45µm (DEUTSCH, 1984).

O método cromatográfico foi o mesmo utilizado para a separação de carotenoides (PACHECO, 2009), sendo o retinol determinado no comprimento de onda 323nm e os carotenoides simultaneamente em 450nm, conforme proposto por Taylor (1983).

3.7 Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram realizadas com derivatização com AQC, com exceção do triptofano que foi detectado através de sua fluorescência natural. O derivatizante foi adquirido na forma de *Kit (AccQ.Fluor reagente, Waters[®])*, que é composto pelo derivatizante e seu diluente, solução tampão para dissolução das amostras hidrolisadas, coluna cromatográfica (C₁₈ 150 x 4,6mm) e solução concentrada de tampão acetato para fase móvel.

A mistura de padrões, 17 aminoácidos mais a amônia, foi adquirida na forma de solução concentrada, armazenada em ampolas de vidro (PN NCI0180, PIERCE[®]). Os padrões de triptofano, cisteína, metionina, prolina e hidroxiprolina foram adquiridos separadamente da Sigma Aldrich[®].

Para a realização das hidrólises foram adquiridas ampolas de vidro borossilicato de 20mL de capacidade (Aliança, Rio de Janeiro). Para o selamento das ampolas foi utilizado maçarico à gás, em um sistema construído na Embrapa Agroindústria de Alimentos que possibilita a aplicação de vácuo e/ou nitrogênio à ampola (Figura 54 página 76). As hidrólises foram conduzidas em estufa (Binder[®] EUA).

Para o preparo da fase móvel de solução tampão de acetato, 200mL do concentrado (*AccQ.Fluor reagente*, Waters[®]) foram transferidos para balão volumétrico de 2000mL e o volume foi aferido com água Milli-Q[®].

Para a dissolução dos hidrolisados foi preparado, no dia da utilização, uma solução de HCl 20mM.

O preparo do reagente de derivatização (AQC) foi de acordo com as instruções do fabricante, ao sólido foi adicionado 1mL do diluente (acetonitrila) fornecido juntamente com o *kit* (Figura 39 página 54). Após a adição, o frasco foi cuidadosamente fechado, agitado em vórtex e levado à estufa a 55°C por 5 minutos. O frasco com a solução AQC foi mantido em dessecador com sílica gel (sem aplicação de vácuo), a sua estabilidade nessas condições é de duas semanas.

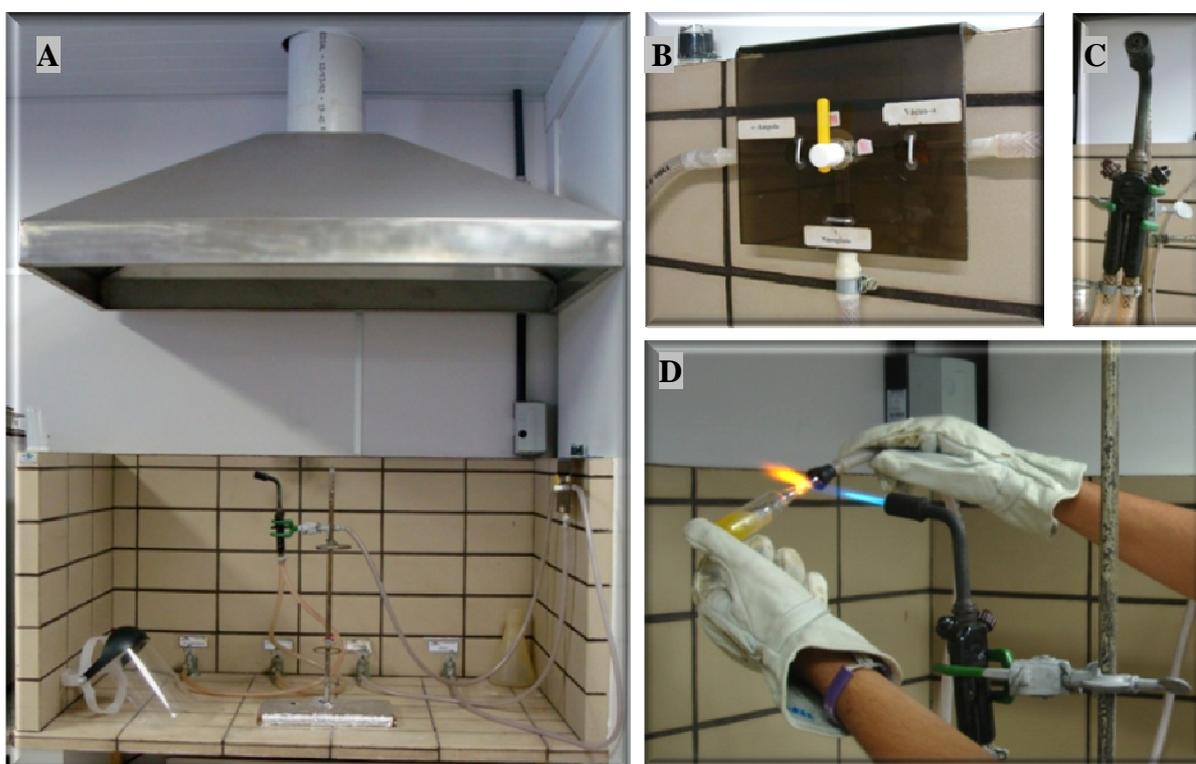


Figura 54 – Sistema de selagem de ampolas para hidrólise de aminoácidos. **A**-Visão geral, **B**- Seletor N₂/Vácuo, **C**-Maçarico GLP/Ar comprimido e **D**- Ampola sendo selada sob vácuo.

Fonte: Fotos do autor.

3.7.1 Hidrólises de amostras proteicas

Quando em se tratando de amostras proteicas, onde os aminoácidos estão ligados através de ligações peptídicas, se fez necessária uma hidrólise para a quebra das proteínas em seus respectivos aminoácidos. Foram utilizadas três hidrólises distintas, baseadas na metodologia de Liu *et al.* (1995), com modificações descritas em detalhes a seguir.

3.7.1.1 Hidrólise ácida

Foi pesada massa de amostra correspondente a 3mg de proteína em ampola de 20mL, em seguida foram adicionados 5mL de ácido clorídrico 6N. A ampola foi então conectada ao tubo de vácuo/nitrogênio e foi realizada a purga do ar, alternando 10 vezes a posição para nitrogênio e vácuo (Figura 54 página 76). A ampola foi então selada sob vácuo no maçarico e em seguida levada à estufa a 110°C por 20h. Após o resfriamento até temperatura ambiente, a ampola foi aberta e o conteúdo transferido para balão volumétrico de 50mL. O volume foi completado com água Milli-Q® e uma alíquota de 50µL foi transferida para o fundo de um vial. O vial foi mantido em dessecador com sílica gel e sob vácuo por aproximadamente 16 horas, ou até completa secura do solvente.

O resíduo seco assim obtido foi submetido à reação de derivatização. Para isso, foram adicionados 20µL do diluente de amostra (HCl 20mM) e o vial foi agitado vigorosamente em vórtex durante 15 segundos. Foram então adicionados 60µL de tampão borato (*Kit AQC*) e o vial foi novamente agitado em vórtex durante 5 segundos. Por fim, foram adicionados 20µL do derivatizante (*Kit AQC*) e a mistura foi agitada imediatamente em vórtex durante 10 segundos. O vial foi deixado em repouso durante um minuto para o término da reação. O volume do vial foi então transferido para redutor de volume (*insert*) e levado para estufa a 55±1°C por 10 minutos. A solução assim obtida foi levada para análise cromatográfica.

3.7.1.2 Oxidação com ácido perfórmico e posterior hidrólise ácida

Para o preparo do ácido perfórmico foram misturados 9 partes de ácido fórmico (Merck®) com 1 parte de peróxido de hidrogênio (Merck®). O volume preparado foi somente o necessário para a utilização de modo a nunca armazenar a solução. A mistura foi feita em frasco com tampa 1 hora antes da sua utilização. Para a oxidação, foi pesada massa de amostra correspondente a 3mg de proteína em ampola de 20mL, as ampolas foram então acondicionadas em caixa térmica de isopor contendo gelo picado. Às ampolas foram então adicionados 500µL do ácido perfórmico preparado e elas foram mantidas no gelo durante 16h, a caixa de isopor foi fechada e mantida sob refrigeração para minimizar o descongelamento. Após decorrido o tempo para a oxidação, as ampolas foram transferidas para capela e foram adicionados 200µL de ácido bromídrico (Merck®). As ampolas foram então transferidas para dessecador de vidro e mantidas sob vácuo por no mínimo 2h para remoção de voláteis.

Decorrido o tempo, as ampolas foram retiradas do dessecador e submetidas ao procedimento descrito anteriormente para a hidrólise ácida (item 3.7.1.1).

3.7.1.3 Hidrólise alcalina

Para a determinação do triptofano proteico foi utilizada a hidrólise alcalina (HUGLI e MOORE, 1972; SATO *et al.*, 1984; NIELSEN e HURRELL, 1985; LIU *et al.*, 1995) com modificações.

Massa de amostra equivalente a 50mg de proteína foi pesada diretamente em ampolas de vidro de 20mL, 170mg de amido de milho (Yoki®) foram adicionadas à ampola. 5mL de solução recém preparada de hidróxido de sódio 4,2N e 100µL de 1-octanol foram adicionadas à ampola. A ampola foi então conectada ao tubo de vácuo/nitrogênio e foi realizada a purga do ar, alternando 10 vezes a posição para nitrogênio e vácuo. A ampola foi então selada sob vácuo no maçarico e em seguida levada à estufa a 110°C por 20h.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, a ampola foi aberta e o conteúdo transferido para balão volumétrico de 50mL que foi então avolumado com água Milli-Q®.

Uma alíquota de 900µL da solução foi transferida para um vial e foi a ele adicionado 100µL de ácido acético glacial. A mistura foi então agitada em vórtex e levada para análise cromatográfica.

3.7.2 Implantação da análise de aminoácidos resistentes à hidrólise ácida

As separações cromatográficas dos aminoácidos resistentes à hidrólise ácida foram realizadas em um sistema cromatográfico Alliance® 2695 (Waters®). Foi utilizado detector de fluorescência (W475 Waters®), ajustado com os comprimentos de onda de excitação (Ex) 250nm e de emissão (Em) 395nm. Duas colunas cromatográficas foram avaliadas para a separação dos aminoácidos. A primeira foi a sugerida e fornecida com o *Kit* AQC (AccQ.Tag® C₁₈; 3,9 x 150mm; 5µm), a outra foi uma coluna mais curta e com tamanho de partícula menor, a Thermo® (BDS Hypersil C₁₈; 4,6 x 100mm; 2,4µm). A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 37°C e o volume de injeção foi 5µL. A eluição foi em modo gradiente de três fases móveis: **A**-Tampão Acetato (*Kit* AQC), **B**-Acetonitrila e **C**-Água (Tabela 5).

Tabela 5 – Composição do gradiente de eluição para separação de aminoácidos.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
Inicial	100	0	0
0,5	99	1	0
18,0	95	5	0
19,0	91	9	0
29,5	83	17	0
33,0	0	60	40
36,0	100	0	0
45,0	100	Equilíbrio	

Fase **A**: Tampão Acetato (*Kit* AQC), Fase **B**: Acetonitrila e Fase **C**: Água.

Fonte: Manual de instruções *AccQ.Tag Chemistry Package*, Waters®, 1993, p. 5-5.

3.7.2.1 Preparo do tampão acetato, fase móvel A, para a análise de aminoácidos

A composição da fase móvel A consiste em solução de acetato de sódio 140mM com 17mM de trietilamina (COHEN e MICHAUD, 1993). Para o preparo de 500mL de fase procedeu-se da seguinte maneira: aproximadamente 10g de acetato de sódio (Merck) foram secos em estufa a 110°C por duas horas e então mantidos em dessecador para resfriamento. Em bécher de 500mL foram adicionados aproximadamente 400mL de água MilliQ, em seguida o bécher foi mantido sob agitação magnética e adicionou-se 1mL de ácido fosfórico 50% (Tedia) e 1185µL de trietilamina (Tedia). Adicionou-se então 5,74g de acetato de sódio previamente seco, após a dissolução completa mediu-se o pH com potenciômetro. Foi então adicionado lentamente e sob agitação ácido fosfórico 50% até pH 5,05. Por fim, a solução foi avolumada para 500mL e filtrada em membrana hidrofílica de 0,45µm.

3.7.3 Implantação do método de análise de aminoácidos sulfurados

Para a implantação da análise cromatográfica dos aminoácidos sulfurados foram utilizados padrões comerciais dos aminoácidos cisteína e metionina e uma amostra de feijão moído, adquirido no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. Procedeu-se a oxidação da amostra e dos padrões de metionina e cisteína individualmente com ácido per fórmico (item 3.7.1.2 página 77). Em seguida seguiu-se com a hidrólise ácida (item 3.7.1.1 página 77).

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C₁₈ da YMC[®] (250 x 4,6mm; 5µm) e a eluição foi em modo gradiente das fases móveis **A**-Tampão acetato de sódio, **B**-Acetonitrila e **C**-Água, conforme Tabela 6. A coluna foi mantida a temperatura de 33°C, o fluxo da fase móvel 1,1mL/min e o volume de injeção foi de 5µL. A corrida cromatográfica foi estabelecida com 35 minutos.

Tabela 6 - Composição do gradiente de eluição para separação cromatográfica de aminoácidos sulfurados.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
Inicial	94	6	0
6,0	92	8	0
12,0	92	8	0
14,0	90,5	9,5	0
25,0	90,5	9,5	0
27,0	0	60	40
30,0	0	60	40
30,5	94	6	0
35,0	94	6	0

Fase **A**: Tampão Acetato (*Kit* AQC), Fase **B**: Acetonitrila e Fase **C**: Água.

Fonte: Eluição proposta pelo autor.

3.7.3.1 Implantação de método de análise rápida para sulfurados

Na tentativa de obter uma separação mais rápida dos derivados AQC oxidados dos aminoácidos sulfurados, utilizou-se uma coluna com tamanho de partículas inferior a 3µm, a Kinetex[®] (C₁₈; 50 x 2,1mm; 2,6µm). O fluxo foi estabelecido em 0,5mL/min e a composição do gradiente utilizado, composto pelas fases **A**-Tampão acetato de sódio e **B**-Acetonitrila, está descrito na Tabela 7 da página 80. A matriz utilizada foi novamente o feijão moído.

Tabela 7 - Composição do gradiente de eluição para separação de aminoácidos sulfurados.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	99,5	0,5
2,0	99,5	0,5
3,5	94,0	6,0
7,5	94,0	6,0
7,7	50,0	50,0
9,0	50,0	50,0
9,2	99,5	0,5
10,0	99,5	0,5

Fase A: Tampão Acetato (*Kit* AQC), Fase B: Acetonitrila.

Fonte: Eluição proposta pelo autor.

3.7.4 Implantação do método de análise de triptofano

A separação do triptofano foi feita em fase reversa na coluna AccQ.Tag[®] C₁₈ (3,9 x 150mm; 5µm), a temperatura da coluna foi mantida em 35°C e a eluição foi em modo isocrático da fase móvel acetonitrila/água/ácido acético, na proporção de 10/89,5/0,5. O fluxo foi de 1,0mL/min e a detecção foi feita por fluorescência nos comprimentos de onda de excitação (Ex) 280nm e emissão (Em) 320nm.

Para o teste de recuperação foi preparada uma solução aquosa de padrão de triptofano (Sigma Aldrich) com concentração de 528pmol. A recuperação foi determinada comparando-se a concentração da solução preparada com a concentração da solução após o procedimento de hidrólise alcalina (item 3.7.1.3 página 77).

O método de determinação de triptofano implantado foi avaliado internamente com a análise de duas matrizes, farinhas de grão de soja e de feijão, adquiridos no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. Uma amostra de amido de milho, utilizado na hidrólise (item 3.7.1.3 página 77), foi analisada representando um branco analítico.

O método implantado foi avaliado ainda por meio de um ensaio interlaboratorial, *INTERLABORATORY TRIAL* 2009, conduzido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) da Colômbia, onde quatro amostras na forma de farinha foram recebidas para dosagem de triptofano.

3.8 Utilização do derivatizante AQC para determinação de álcoois

Para a avaliação da aplicação do método de derivatização com AQC para a análise de álcoois, foram preparadas soluções a 1% dos seguintes álcoois em água: metanol, etanol, propanol e butanol (Tedia[®], EUA). Foi ainda preparada uma solução com a mistura a 1% de cada álcool.

As reações de derivatização nas soluções preparadas foram realizadas com 10µL de solução, 70µL de tampão e 20µL de AQC. O método de análise cromatográfica foi melhorado a partir do método previamente implantado para análise de aminoácidos resistentes à hidrólise ácida (Tabela 5 página 78).

3.9 Utilização do derivatizante AQC para determinação de hidroxiprolina (colágeno)

Para o teste de aplicação do método de derivatização com AQC a análise de hidroxiprolina (colágeno) e construção de curva analítica, foram utilizados padrões de prolina e hidroxiprolina (Sigma Aldrich). Massa de 50,4mg de cada padrão foi pesada e transferida para balão volumétrico de 100mL. O sólido foi dissolvido com 100mL de água MilliQ® acidificada com 3 gotas de HCl 6M. Volume de 10µL dessa solução foi utilizado para a reação de derivatização com AQC, desta maneira, a solução final obtida apresentou uma concentração de 50,4ng/µL.

Como amostras para avaliação do método foram utilizadas carne bovina, suína e pele de frango, adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com posterior derivatização com AQC (item 3.7.1.1 página 77). As massas utilizadas para a hidrólise foram 500mg para as carnes bovina e suína e 50mg para a pele de frango, por ser esta mais rica em colágeno.

3.10 Implantação e melhoria de método de análise de metilxantinas

A análise cromatográfica de cafeína, teofilina e teobromina foi realizada em um sistema cromatográfico Alliance® da Waters com detector de arranjo de fotodiodos na faixa de 220 a 450nm, com determinação em 280nm. A eluição foi a 1,3mL/min em modo isocrático da mistura Água/Acetonitrila/Ácido acético, na proporção 89,5:10:0,5. O volume de injeção foi de 3µL e a temperatura da coluna 30°C. Foram testadas duas colunas para a separação: Waters C₁₈ (150 x 4,6mm; 5µm) e Thermo C₁₈ (100 x 4,6mm; 2,4µm).

Três amostras em pó foram analisadas: Café torrado e moído, achocolatado e guaraná, adquiridos no comércio varejista do município do Rio de Janeiro. A extração foi realizada com a própria fase móvel em banho de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida as amostras foram avolumadas para 25mL em balão volumétrico e uma alíquota foi filtrada em filtro de seringa Millex® de 0,45µm diretamente para vial do injetor.

3.11 Análise de produtos de degradação do ATP (hipoxantina)

A separação dos nucleotídeos foi realizada em coluna Thermo C₁₈ (100 x 4,6mm; 2,4µm) com eluição gradiente de acetonitrila e tampão fosfato (0,04M KH₂PO₄ e 0,06M K₂HPO₄). O gradiente consistiu em elevar a concentração de acetonitrila de 0 para 25% em 5 minutos (STOCCHI *et al.*, 1985). A detecção foi em detector de arranjo de fotodiodo 2996 (Waters®) em 254nm. O fluxo da fase móvel foi 1,3mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 5µL. Os padrões avaliados foram inosina monofosfato, adenosina monofosfato, hipoxantina e inosina (Sigma Aldrich).

Amostras de peixe foram adquiridas diretamente de barcos pesqueiros no Município de Maricá (Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro), estes foram armazenados em freezer até a análise. A extração dos nucleotídeos foi realizada conforme metodologia descrita por Andrade *et al.* (2012). Uma alíquota de 50mg da amostra foi coletada de diferentes porções musculares do peixe e homogeneizada com 1mL de ácido perclórico (HClO₄) a 8% em ultrassom por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200µL de hidróxido de potássio (KOH) 6M e homogeneizou-se em vórtex durante 20 segundos. Posteriormente, centrifugou-se a 9000rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para vial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de padrões analíticos por cromatografia líquida em escala analítica

Em geral, o preparo de substâncias puras para utilização como padrão analítico se dá através de síntese química ou de extrações a partir de fontes naturais, seguidas de etapas de purificação. Para a purificação normalmente são empregadas técnicas como a partição em solventes e a recristalização.

A utilização da cromatografia líquida para a purificação de substâncias normalmente se dá através da cromatografia clássica, onde separações de extratos são realizadas em colunas abertas de grande capacidade, ou ainda em sistemas cromatográficos preparativos. Neste caso, as colunas cromatográficas são empacotadas em escala maior que as colunas analíticas, dessa maneira, é possível se obter quantidades relativamente grandes de substâncias isoladas.

A proposta deste trabalho para o preparo de padrões, foi verificar a capacidade da cromatografia líquida em escala analítica, utilizando sistema cromatográfico analítico, colunas comerciais e métodos de separação desenvolvidos para análise, em separar componentes majoritários e minoritários com alta pureza e em quantidades suficientes para sua utilização como padrões cromatográficos.

A obtenção de padrões cromatográficos desta maneira é uma alternativa para laboratórios de análise, que dependem, muitas vezes, de importação e disponibilidade comercial destas substâncias. Substâncias de três classes de grande interesse para a ciência de alimentos foram isoladas: carotenoides, flavonoides e retinóis.

4.1.1 Purificação de carotenoides minoritários

Quatro carotenoides comumente encontrados em pequenas concentrações em alimentos, porém com grande importância biológica, foram escolhidos para isolamento, foram eles: a zeinoxantina e três isômeros *cis*, um do licopeno e dois do β -caroteno.

4.1.1.1 Obtenção de zeinoxantina e β -criptoxantina de cajá manga

A Figura 55 da página 83 apresenta o cromatograma do extrato saponificado de cajá manga (A), além do cromatograma e espectro da zeinoxantina isolada através de coleta manual (B). A zeinoxantina assim obtida apresentou pureza cromatográfica de 99,0%. Valor superior ao obtido em trabalho prévio¹⁴ utilizando isolamento em coluna aberta, e extrato de polpa do fruto cajá mirim (*Spondias mombin* L.), quando foi obtido zeinoxantina com pureza de 91,4%. O perfil cromatográfico dos carotenoides das duas espécies de cajá é semelhante, o que permitiu a comparação entre as purezas dos dois métodos de isolamento da zeinoxantina.

A obtenção de zeinoxantina com grau de pureza inferior, pelo método de separação em coluna aberta, pode ser justificada pelo fato da zeinoxantina, neste caso, ser componente minoritário (Figura 55 A página 83) e ainda pela presença de muitos interferentes com eluição próxima. Além disto, há a presença de isômeros, o que torna o isolamento em coluna aberta bastante difícil. Tais fatores não trazem muitas dificuldades quando se está usando a separação em coluna analítica, com resolução muito superior à da coluna aberta e ainda capaz de separar os isômeros. Apesar da diferença no grau de pureza, os valores obtidos nas duas formas de separação são suficientemente altos para a utilização da substância isolada como padrão cromatográfico.

¹⁴ A zeinoxantina foi isolada para atender demanda da aluna Julia Hauck Tiburski (TIBURSKI, 2009), os resultados foram publicados em coautoria (TIBURSKI *et al.*, 2011).

O método de coleta manual se mostrou muito eficiente mesmo para o isolamento de substância em baixa concentração, e ainda na presença de muitos interferentes em concentração muito superior, como foi no caso da coleta da zeinoxantina do extrato de cajá.

Mesmo com a presença de um interferente em parcial coeluição, destacado com o círculo na Figura 55 A, foi possível a coleta de apenas o pico referente à zeinoxantina, como comprova o cromatograma da injeção da solução coletada (Figura 55 B).

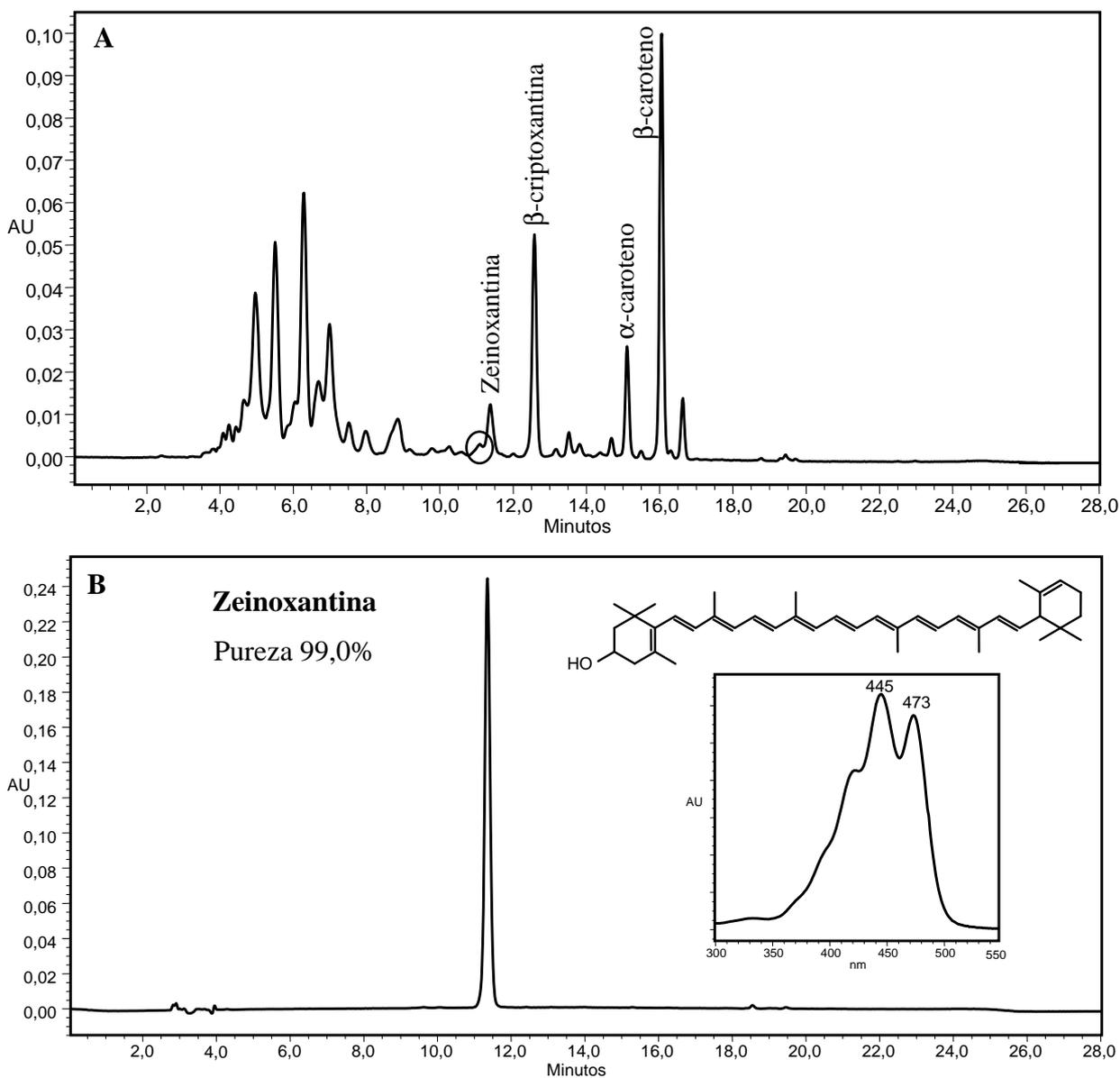


Figura 55 – A- Cromatograma do extrato de cajá manga B- Cromatograma, estrutura e espectro do padrão de zeinoxantina obtido por coleta manual de injeções de extrato de cajá manga.

O mesmo extrato preparado a partir de cajá manga, ainda foi utilizado para o isolamento da xantofila β -criptoxantina. Apesar de existirem fontes alternativas com maiores concentrações deste carotenoide, como por exemplo as polpas dos frutos de caqui e mamão (PACHECO, 2009), o isolamento foi realizado para aproveitar a presença deste carotenoide em elevada concentração no extrato preparado para o isolamento de zeinoxantina, do mesmo modo que existia a necessidade de quantificação deste nas amostras de cajá, assim, evitou-se novos procedimentos de extração com uma nova matriz.

Para tanto, duas técnicas de separação cromatográficas foram utilizadas em conjunto, primeiramente o extrato de cajá foi pré-purificado em coluna aberta, e em seguida a fração referente à β -criptoxantina foi isolada em coluna cromatográfica analítica. O cromatograma obtido revelou alta concentração de β -criptoxantina com pequenas quantidades de impurezas, basicamente zeinoxantina e isômeros *cis* de β -criptoxantina.

Uma alteração no método cromatográfico original, que consistiu em alterar o modo de eluição de gradiente para isocrático (60:40 Metanol/Éter metil-*terc*-butílico), permitiu a rápida separação da β -criptoxantina destes interferentes em apenas quatro minutos de corrida cromatográfica. Desta maneira, foi possível programar o injetor para efetuar injeções sucessivas (90 em 90 segundos) e coletar manualmente a β -criptoxantina eluída na saída do detector. A Figura 56 apresenta uma fração do cromatograma obtido dessas injeções sucessivas.

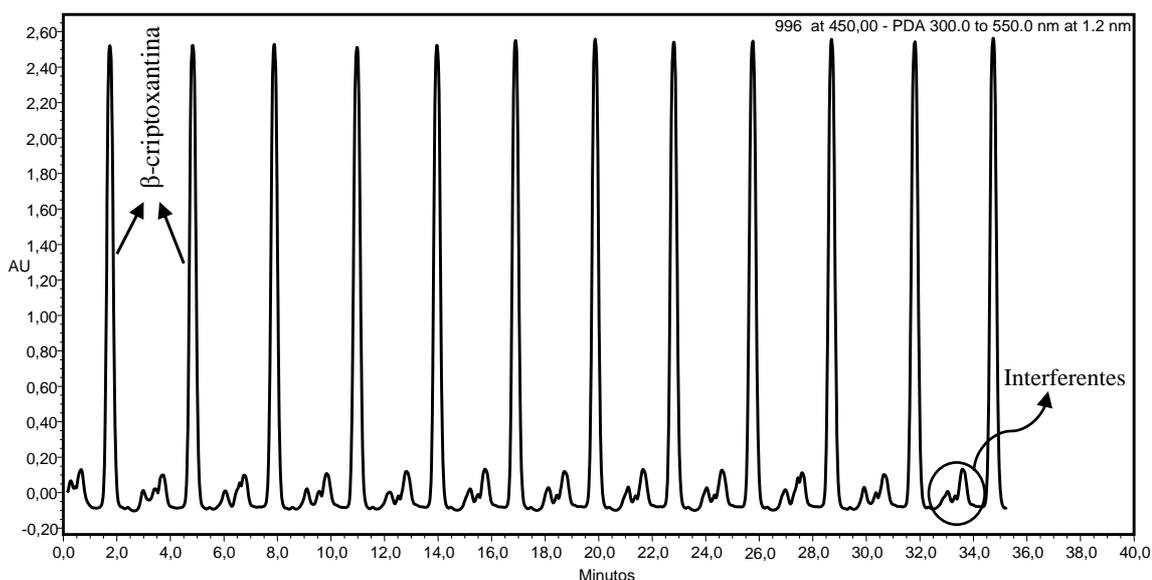


Figura 56 – Cromatograma de injeções sucessivas de extrato de cajá pré-purificado em coluna aberta, os picos mais intensos são referentes à β -criptoxantina.

Com o método de injeções sucessivas em modo isocrático foi possível, com 26 injeções, o que levou aproximadamente uma hora, obter β -criptoxantina com 98,3% de pureza. A quantidade obtida foi suficiente para a quantificação por espectrofotometria e ainda a sua utilização como padrão cromatográfico (Figura 57 página 85).

O método demonstrou a viabilidade de se preparar os padrões analíticos a partir da própria matriz estudada, poderiam ainda ter sido isolados, do mesmo extrato de cajá, os padrões de α -caroteno e β -caroteno, o que não foi realizado pois estes padrões estavam disponíveis. Este procedimento traz muita facilidade e agilidade à obtenção de padrões, do

mesmo modo que reduz muito os custos analíticos se comparados à aquisição comercial dos padrões.

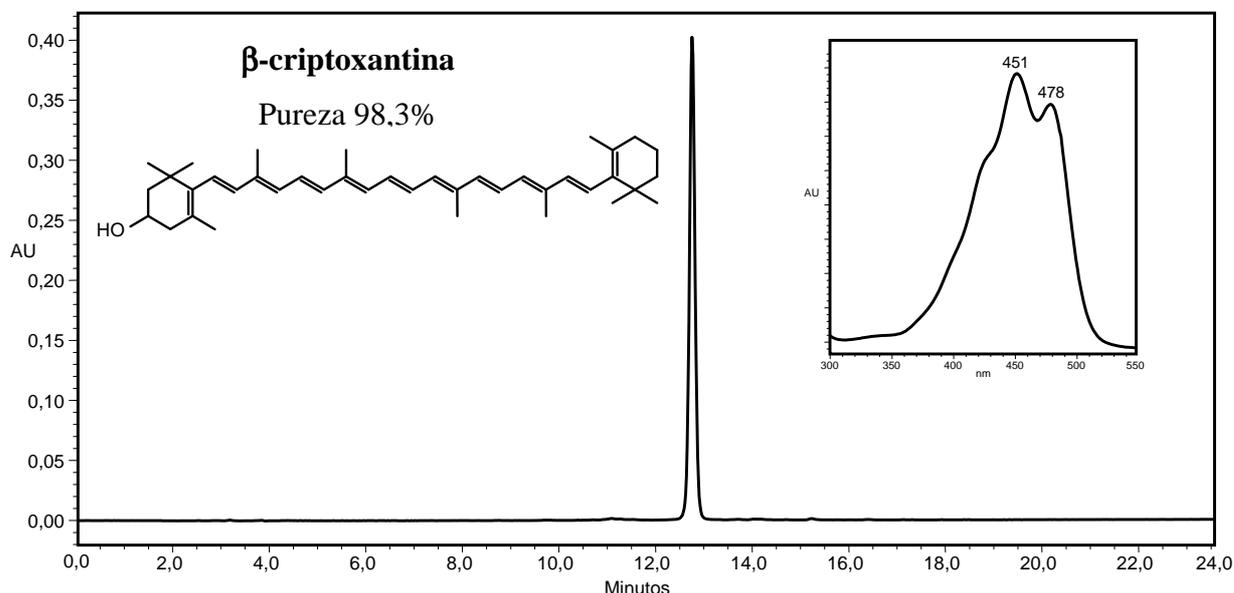


Figura 57 – Cromatograma, estrutura e espectro do padrão de β -criptoxantina obtido por coleta manual de injeções de extrato de cajá pré-purificado em coluna aberta.

4.1.1.2 Obtenção de isômero *cis* de licopeno de Melão-de-São-Caetano

A extração e análise qualitativa dos carotenoides dos arilos dos frutos de Melão-de-São-Caetano (*Mormodica charantia* L.), confirmou ser esta uma excelente fonte de licopeno na forma *trans*. Conforme relatado anteriormente, a pureza deste carotenoide é naturalmente superior a 94% e seu extrato pode ser utilizado como padrão analítico deste carotenoide, sem a necessidade de procedimentos de purificação (PACHECO, 2009).

A acidificação do extrato obtido, seguida de eluição através de coluna aberta de sílica, resultou na separação de três bandas cromatográficas. As bandas foram coletadas separadamente e analisadas no método cromatográfico para verificação do perfil de carotenoides. A formação de múltiplas bandas indica a transformação da substância, haja visto que o extrato inicial apresentava apenas uma substância (*trans*-licopeno). De fato, a análise cromatográfica revelou que todas as frações coletadas apresentavam ainda o *trans*-licopeno como carotenoide majoritário, no entanto, em todas as bandas coletadas surgiu um grupo de picos referentes aos isômeros *cis*-licopeno, formados durante a eluição ácida através da sílica ativada.

Como o objetivo desta etapa do trabalho não era a identificação dos isômeros formados, e sim o de avaliar a capacidade do isolamento de substâncias via cromatografia analítica, um dos isômeros *cis*, presente minoritariamente na primeira fração (Figura 58 B, pico 8), foi escolhido para o isolamento através de coleta manual.

A Figura 58 da página 86 traz os cromatogramas obtidos do extrato dos arilos do Melão-de-São-Caetano (A), o cromatograma da primeira fração recolhida na coluna aberta (B) e o cromatograma da solução isolada pelo método de coleta manual do pico identificado como 8 (C).

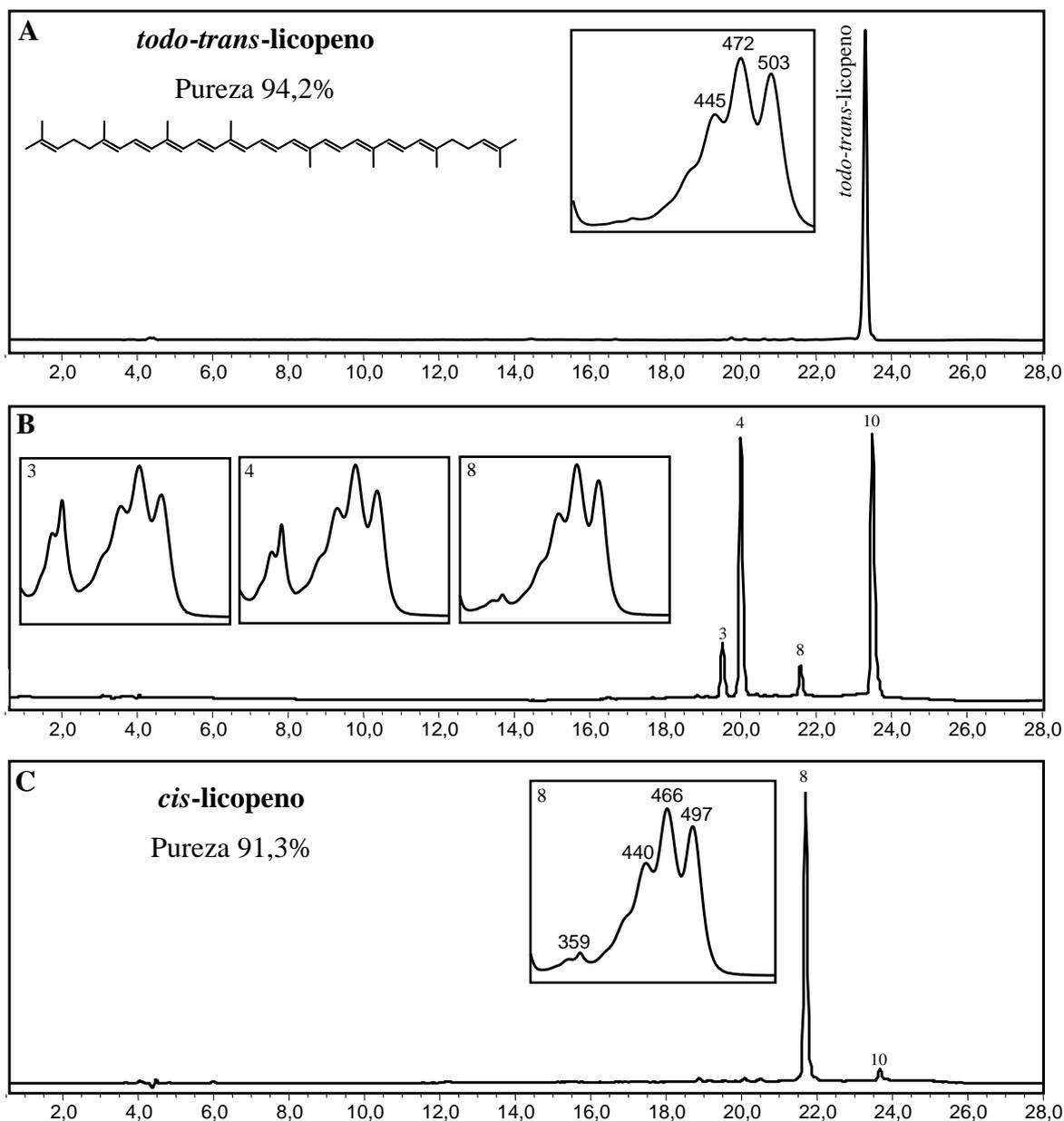


Figura 58 – **A**- Cromatograma do extrato dos arilos do Melão-de-São-Caetano.
B- Cromatograma da primeira fração separada na coluna aberta de sílica.
C- Cromatograma do isômero *cis* coletado manualmente na saída do detector.

A utilização de eluição ácida através de coluna aberta de sílica ativada, mostrou-se eficiente para promover a isomerização de parte do *trans*-licopeno dos arilos de Melão-de-São-Caetano em um número grande de isômeros *cis*. Foi possível, através da análise cromatográfica, a visualização de 29 substâncias, provavelmente todas isômeros *cis*-licopeno, separadas nas 3 frações coletadas na coluna aberta (dados não apresentados).

Com o uso do isolamento através de CLAE, obteve-se um dos isômeros, que mesmo em baixa concentração na fração inicial, apresentou pureza cromatográfica de 91,3%, demonstrando a viabilidade em preparar e isolar isômeros *cis*-licopeno a partir de *todo-trans*-licopeno para a utilização como padrão analítico.

Caso fosse de interesse a identificação dos isômeros formados, seria perfeitamente viável a utilização da CLAE para isolar quantidades maiores das substâncias formadas, o que se faz necessário para a elucidação estrutural através de técnicas como ressonância nuclear magnética (RMN), espectrometria de massas e espectroscopia UV/Vis e de infravermelho. A única diferença seria a necessidade de mais tempo de coleta para se atingir as quantidades necessárias de substâncias isoladas, na ordem de miligramas.

4.1.1.3 Obtenção de isômeros *cis* de β -caroteno de alface

O perfil cromatográfico da fase recolhida em coluna aberta do extrato de folhas de alface (Figura 59 A), mostrou elevada concentração de β -caroteno com concentrações menores dos isômeros 9 e 13-*cis*- β -caroteno. Isto era esperado, pois sabe-se que os carotenoides dos cloroplastos de folhas, como no caso do alface, apresentam pequena variação em sua composição, apresentando naturalmente os isômeros *cis*- β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A ausência de outros picos interferentes, removidos na etapa da cromatografia em coluna aberta, novamente permitiu que o método de eluição gradiente original fosse alterado para isocrático (52:48 Metanol/Éter metil-*terc*-butílico). Deste modo, foi possível a realização de injeções sucessivas que foram programadas de 4 em 4 minutos. Ao longo das injeções, o volume de injeção pôde ainda ser ajustado para maximizar o rendimento da coleta, sendo estabelecido em 25 μ L sem prejuízos à separação cromatográfica (Figura 59).

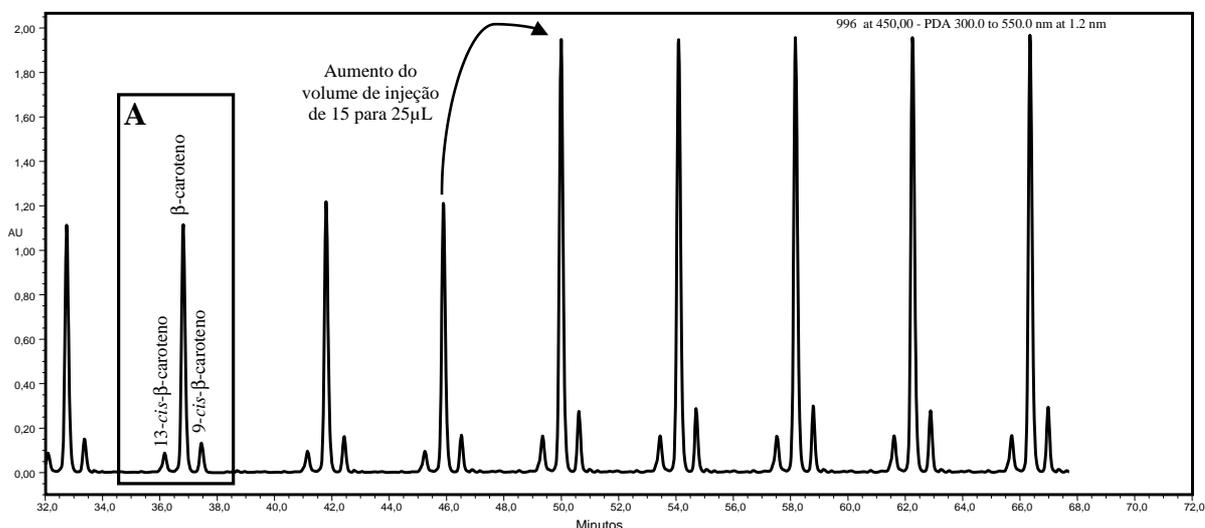


Figura 59 - Cromatograma de injeções sucessivas de extrato de alface pré-purificado em coluna aberta. Em destaque (A) o perfil cromatográfico do extrato obtido.

A coleta dos dois isômeros *cis* do β -caroteno foi feita manualmente. Para a determinação da pureza das substâncias isoladas, o solvente das duas frações coletadas foi removido sob fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido com 200 μ L de acetona. As soluções obtidas foram então injetadas no método cromatográfico analítico para determinação das purezas. As purezas calculadas foram de 93,0% para o 13-*cis*- β -caroteno e de 98,3% para o 9-*cis*- β -caroteno (Figura 60 página 88).

O método de isolamento proposto se mostrou viável para a obtenção de isômeros *cis* de β -caroteno. Foram obtidas purezas suficientes (>90%) para utilização dos isolados como padrões cromatográficos. O procedimento viabilizou a correta determinação cromatográfica do potencial pró-vitâmico A de alimentos, que depende da quantificação dos isômeros *cis* e *trans* do β -caroteno presentes nas matrizes.

Os valores inferiores de pureza dos isômeros *cis* obtidos (93,0 e 98,3%), em relação às demais substâncias assim preparadas, pode ser justificado pela presença no extrato do *trans- β -caroteno em concentração muito superior, e ainda com eluição próxima aos isômeros *cis* coletados, prova disto é ser o β -caroteno a única impureza presente nas duas frações coletadas (Figura 60).*

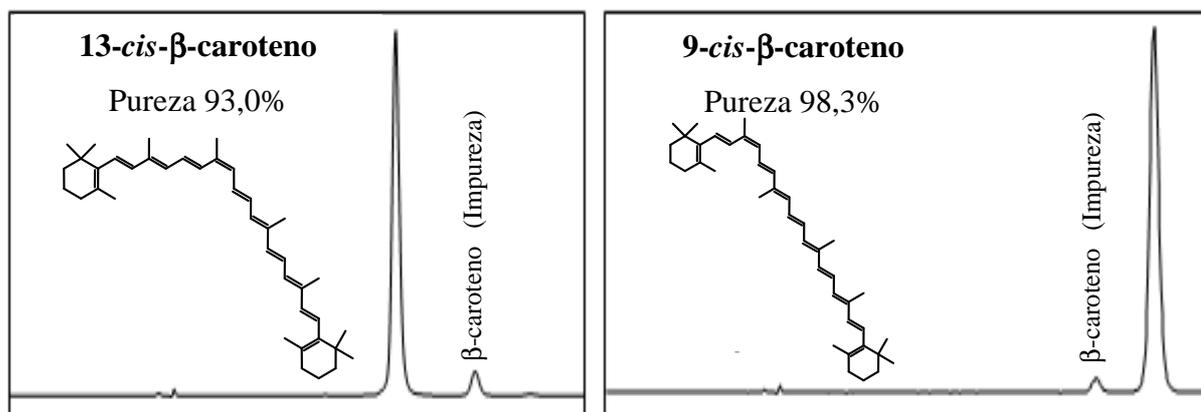


Figura 60 – Cromatogramas e estruturas dos padrões de 13-*cis* e 9-*cis*- β -caroteno obtidos por coleta manual de injeções de extrato de folhas de alface pré-purificado em coluna aberta.

4.1.2 Purificação de carotenoides majoritários

Após a comprovação da capacidade da utilização da CLAE em purificar substâncias com alta pureza, mesmo quando em baixas concentrações (componentes minoritários), a próxima etapa deste trabalho foi verificar a eficiência e a viabilidade deste procedimento de isolamento, avaliando o tempo gasto no processo e o volume de solventes utilizados. Sendo ainda importante determinar se as quantidades de substâncias isoladas são suficientes para a sua quantificação e utilização como padrões analíticos.

4.1.2.1 Obtenção de alfa e β -caroteno de cenoura

Na Figura 61 da página 89 são apresentados os cromatogramas obtidos com a injeção das soluções de alfa e β -caroteno isolados de cenoura e coletados manualmente na saída do detector. Conforme pode ser observado nos dois cromatogramas, há a presença de apenas um pequeno pico de impureza, com concentração inferior a 1% e que correspondente ao carotenoide complementar presente no extrato de original cenoura. Isto demonstra que o método de isolamento manual foi eficiente mesmo na presença de interferentes em alta concentração e com tempo de retenção próximo ao tempo de retenção da substância a ser isolada.

A quantificação espectrofotométrica dos dois carotenoides isolados revelou que, com apenas cinco injeções de 15µL de extrato de cenoura, foram obtidos 16,5µg de α-caroteno e 19,6µg de β-caroteno.

As quantidades obtidas pelo método são pequenas, especialmente se considerarmos a massa necessária para preparo de soluções de calibração por pesagem, no entanto, são quantidades suficientes quando em se tratando de preparo destas soluções através de quantificação espectrofotométrica.

De fato, se considerarmos a construção de uma curva analítica de um carotenoide qualquer, quantificando as soluções mãe por espectrofotometria, e considerando a preparação de sete pontos de concentração obtidos por diluição da solução mãe, na faixa de 0,5 a 8,0µg/mL em triplicata, seriam efetivamente utilizados apenas 5µg do carotenoide purificado. Assim sendo, as quantidades obtidas de alfa e β-caroteno neste experimento teoricamente seriam suficientes para a construção de até três curvas analíticas.

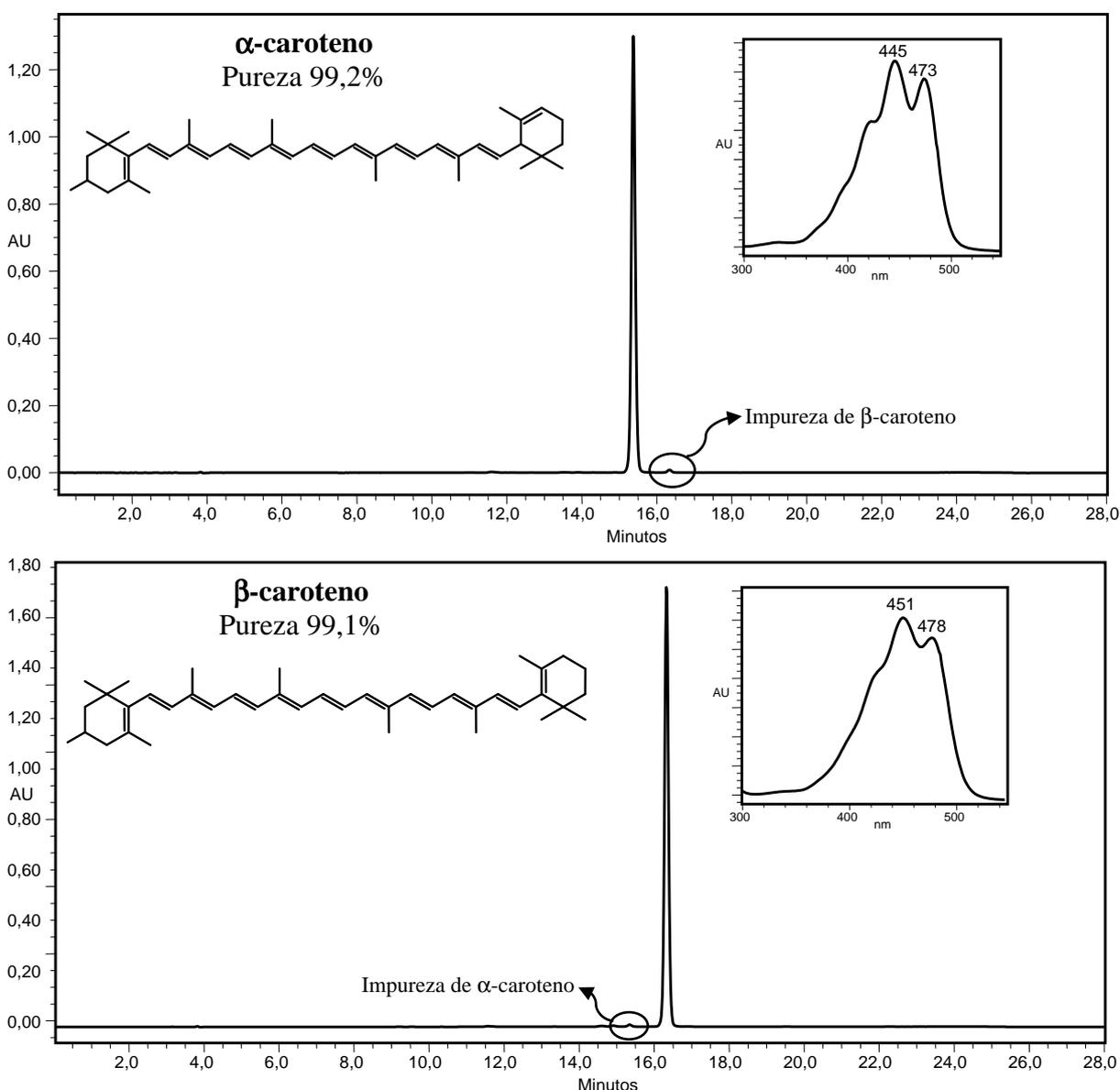


Figura 61 - Cromatogramas, estruturas e espectros dos padrões de alfa e β-caroteno obtidos por coleta manual de injeções de extrato de cenoura.

As cinco injeções realizadas no método cromatográfico analítico para a coleta simultânea dos carotenoides alfa e β -caroteno, levaram 2 horas e 20 minutos. Para tanto, foram consumidos 112mL de solventes, referentes ao gasto de fase móvel. Desta maneira, foi possível a extração dos carotenoides da matriz, o isolamento cromatográfico das substâncias de interesse, sua avaliação quanto a pureza cromatográfica e a construção da curva analítica em apenas um dia de trabalho. Sendo que o maior consumo de tempo foi na injeção dos pontos da curva analítica.

Sendo assim, pode-se afirmar que não há vantagem no isolamento de grandes quantidades de padrões para armazenamento e uso posterior, pois isso demandaria muito mais tempo e grande consumo de solventes. Além disso, a estocagem de padrões demandaria avaliações das melhores formas de armazenamento e ainda estudos de estabilidade para determinação do tempo de viabilidade dos padrões armazenados.

A limitação para a obtenção dos padrões é a disponibilidade da matriz utilizada, por isso a constante busca por mais opções e a preferência pela utilização de matrizes que estejam disponíveis durante todo o ano, como cenoura, alface e outras facilmente encontradas no mercado varejista.

O consumo baixo de solventes, quando comparado com técnicas tradicionais de isolamento e purificação de substâncias, também é ponto favorável no isolamento através da cromatografia em escala analítica, estando em consonância com a preocupação em menor consumo de solventes e menor geração de resíduos químicos, que devem ter destinação adequada.

4.1.3 Novas fontes vegetais de carotenoides

Com as constantes buscas por matrizes vegetais ricas em carotenoides, para mais opções e maior rendimento no isolamento dessas substâncias, foram identificadas neste trabalho duas fontes de licopeno e três de zeaxantina até então não relatadas. A seguir detalhes das espécies estudadas com os perfis e teores de carotenoides determinados.

4.1.3.1 Caferana (*Bunchosia armeniaca*) como fonte de licopeno

A espécie *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC., pertencente à família *Malpighiaceae*, é nativa dos Andes e seu nome popular é fruta de manteiga de amendoim (*peanut butter fruit*). No Brasil, é cultivada há muito tempo apenas em quintais, e é conhecida como caferana, cafezinho, ciruela, caramela, ameixa-do-pará ou ameixa brava (LORENZI *et al.*, 2006).

Os frutos de caferana quando ainda imaturos apresentam coloração alaranjada e textura rígida (Figura 62 **A** página 91). Ao final da maturação, os frutos rapidamente sofrem alteração na sua coloração, tornando-se vermelhos intensos (Figura 62 **B** página 91). Quando maduros, apresentam aroma semelhante ao de amendoim e textura pastosa, o sabor é muito doce e lembra o de ervilhas em conserva.

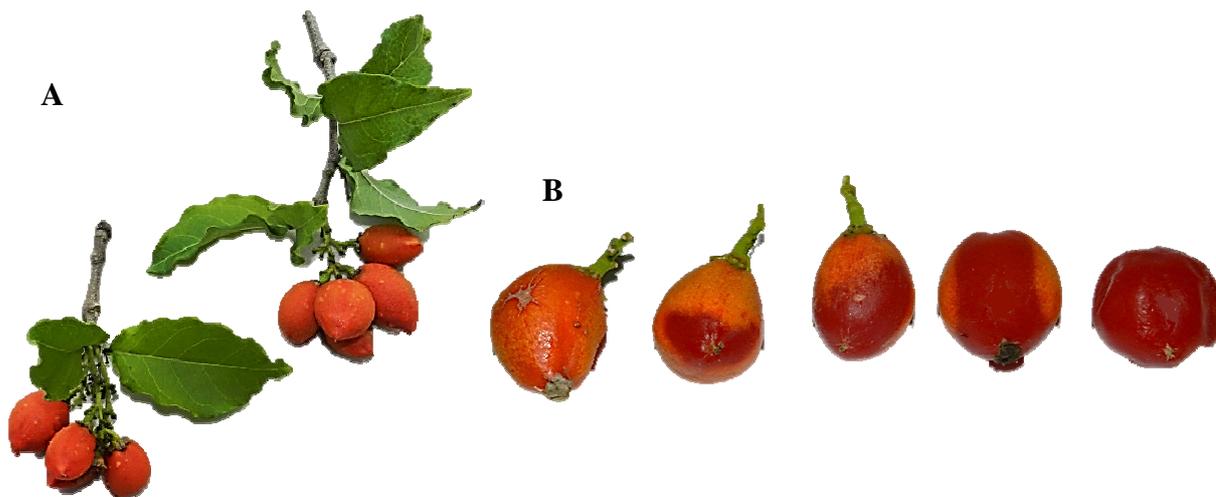


Figura 62 – A- Ramos com frutos de caferana e B- Estádios de maturação do fruto.

Fonte: Fotos do autor.

A análise dos carotenoides revelou que a polpa dos frutos de caferana apresentam em média 400 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides totais, destes, 89% são licopeno (360 $\mu\text{g/g}$), seguidos de β -caroteno (25 $\mu\text{g/g}$) e luteína (3 $\mu\text{g/g}$) (Figura 63).

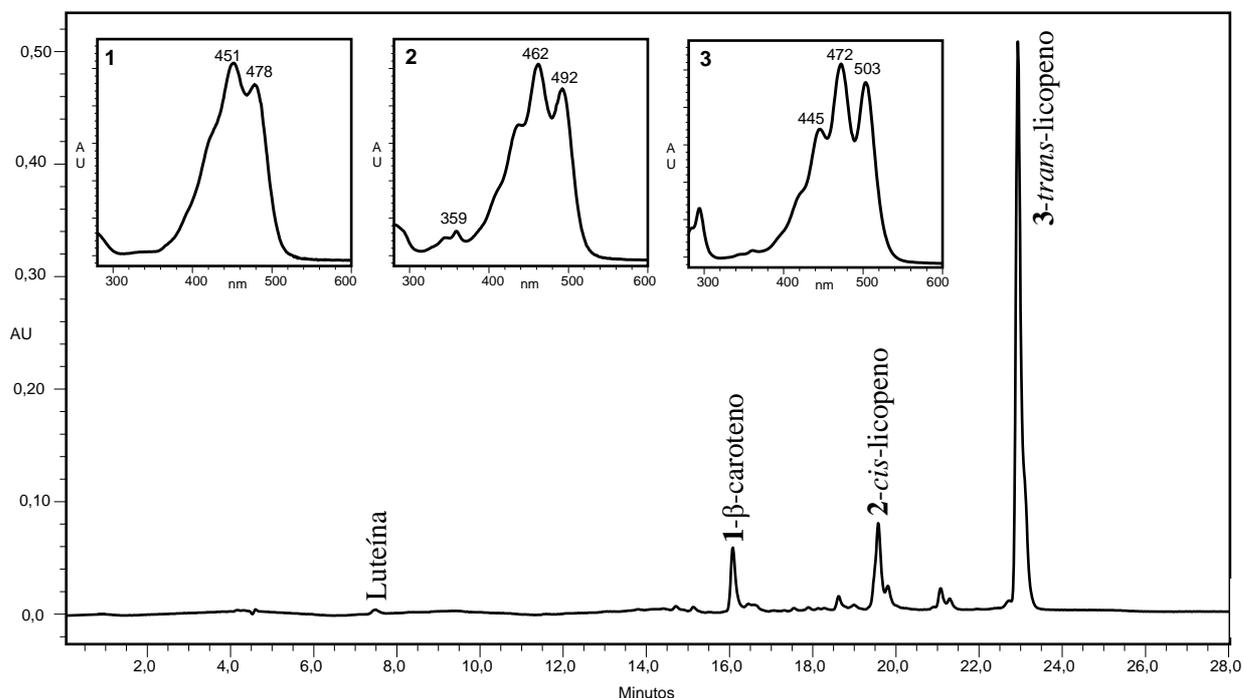


Figura 63 – Perfil cromatográfico dos carotenoides do extrato da polpa de frutos de caferana.

O teor determinado de licopeno para a polpa de caferana se mostrou dez vezes superior ao encontrado em polpa de tomate (35 $\mu\text{g/g}$), a principal fonte deste carotenoide da dieta (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Considerando que os frutos da caferana apresentam massa variando de 4 a 9g, e que desta massa 70% representa a polpa, a caferana se mostra uma excelente opção para a alimentação como fonte de licopeno, sendo que o consumo de apenas 3 frutos seriam suficientes para atingir a dose mínima diária recomendada deste carotenoide, que é de 5 a 20mg/dia (RAO e SHEN, 2002).

4.1.3.2 *Eugenia punicifolia* como fonte de licopeno

A *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC., conhecida popularmente como murta ou cerejada-praia, apresenta fruto com aproximadamente 1cm de diâmetro, muito vermelho quando maduro (Figura 64). Distribui-se por quase todo o Brasil, nas restingas do Rio de Janeiro ocorre nas seguintes áreas: Reserva da Praia do Sul, Marambaia, Grumari, Jacarepaguá, Maricá, Cabo Frio, Barra de São João, Macaé e São João da Barra (SOUZA e MORIM, 2008; KUHLMANN e FAGG, 2012).



Figura 64 – Frutos maduros de *Eugenia punicifolia*.

Fonte: Foto da esquerda: Luciana Mouta de Oliveira e foto da direita do autor.

A determinação dos carotenoides revelou que a polpa dos frutos de *Eugenia punicifolia* apresentou em média 632 μ g/g de carotenoides totais, destes, 87% são licopeno (550 μ g/g), nas formas *cis* e *trans*, seguidos de β -criptoxantina (31 μ g/g) e zeaxantina (31 μ g/g) (Figura 65 página 93).

Assim sendo, o teor determinado de licopeno para a polpa de *Eugenia punicifolia* se mostrou ainda superior ao determinado para a caferana (360 μ g/g).

Apesar do teor elevado de licopeno, em se tratando de fruto pequeno e de pouca polpa, a caferana apresenta maior potencial para utilização na alimentação como fonte alternativa deste carotenoide. No entanto, a utilização dos frutos da *E. punicifolia* deve ser considerada por se tratar de fruto nativo e ainda carente de estudos de composição.

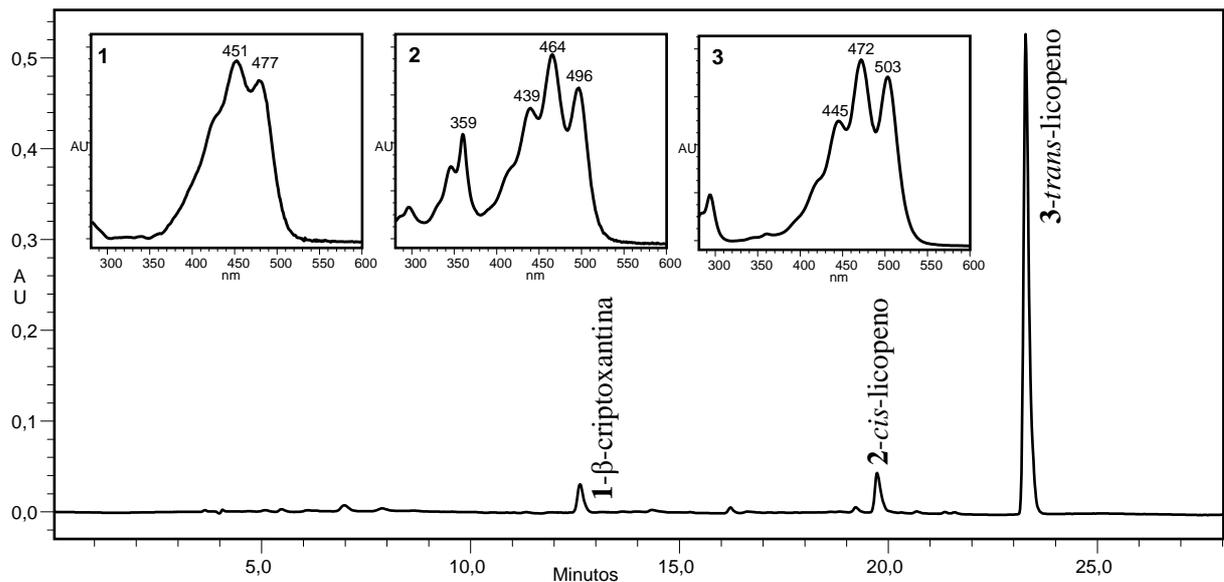


Figura 65 - Perfil cromatográfico dos carotenoides do extrato da polpa de frutos de *Eugenia punicifolia*.

4.1.3.3 Melão-de-São-Caetano (*Mormodica charantia* L.) como fonte de zeaxantina

Os arilos das sementes do fruto de Melão-de-São-Caetano (Figura 66), como mencionado anteriormente, foram relatados como excelente fonte de licopeno, alcançando teores de 560 μ g/g. Devido a quase exclusividade do licopeno nos extratos dos arilos (96%), estes podem inclusive ser utilizados como padrão analítico sem a necessidade de purificação (PACHECO *et al.*, 2012).



Figura 66 – Fruto aberto de Melão-de-São-Caetano expondo as sementes envoltas em arilo vermelho e pericarpo alaranjado.

Fonte: Foto do autor.

Por apresentar coloração típica de carotenoides, o pericarpo amarelo do fruto também foi analisado. Os resultados revelaram um perfil de carotenoides bastante diferente da composição dos arilos das sementes (Figura 67). O teor de licopeno determinado foi de apenas 0,4% do valor de carotenoides totais, enquanto o carotenoide majoritário foi a zeaxantina (42,7%) seguida por β -criptoxantina (34,5%), β -caroteno (10,2%) e luteína (2,5%).

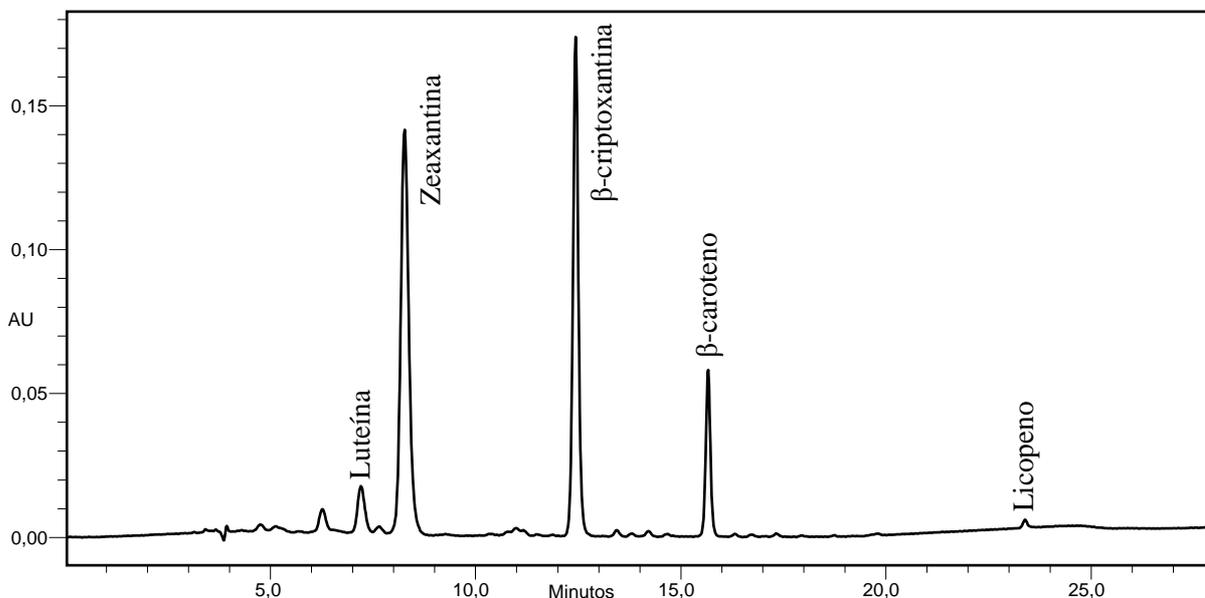


Figura 67 – Cromatograma do extrato saponificado do pericarpo maduro do fruto de Melão-de-São-Caetano.

Assim sendo, o pericarpo do fruto de Melão-de-São-Caetano se mostrou uma excelente fonte de zeaxantina, carotenoide em geral encontrado minoritariamente em alimentos. Em se tratando de fruto comestível, este pode ser considerado uma fonte alternativa deste carotenoide para alimentação. A concentração média de zeaxantina determinada no pericarpo foi de $68\mu\text{g/g}$, o que representa 17 vezes mais que o milho verde *in natura* ($4,0\mu\text{g/g}$), a fonte vegetal mais consumida de zeaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Devido ao sabor extremamente amargo do pericarpo do fruto de Melão-de-São-Caetano ele é conhecido como melão amargo (*Bitter melon*), e é apreciado por orientais para consumo *in natura*, ou como ingrediente no preparo de condimentos (BASCH *et al.*, 2003). No Brasil, o Melão-de-São-Caetano é muito apreciado, especialmente por crianças, que consomem apenas os arilos vermelhos e doces das sementes.

Uma alternativa para o consumo do pericarpo do fruto para incrementar a ingestão de zeaxantina seria o seu consumo em forma de pó desidratado. Este por sua vez poderia ser utilizado em formulações, para enriquecimento de produtos com este carotenoide de papel tão importante para a saúde humana.

A fim de avaliar a estabilidade da zeaxantina durante o processamento do Melão-de-São-Caetano, foi preparado, através de liofilização seguida de moagem, um pó desidratado dos pericarpos maduros dos frutos coletados.

O teor de carotenoides totais do pó obtido foi de $1314\mu\text{g/g}$, e o teor de zeaxantina alcançou $508\mu\text{g/g}$. Quando comparado com farinha de milho (fubá), cujo teor de zeaxantina é de $9,4\mu\text{g/g}$ (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008), a farinha preparada com os pericarpos de

Melão-de-São-Caetano apresentou teor 54 vezes superior. Desta maneira, ela pode ser considerada uma excelente alternativa para a ingestão deste carotenoide na forma de ingrediente alimentar.

4.1.3.4 *Clusia fluminensis* e *Clusia major* como fontes de zeaxantina

Teores elevados de zeaxantina também foram encontrados nos frutos de duas espécies do gênero *Clusia*; a *Clusia fluminensis* e a *Clusia major*. Ambas são espécies bastante utilizadas para ornamentação e são facilmente encontradas na forma nativa nas restingas do Rio de Janeiro.

As partes dos frutos analisados foram os arilos das sementes, que apresentam coloração bastante característica de carotenoides (Figura 68).



Figura 68 – Frutos abertos de *Clusia fluminensis* (esquerda) e *Clusia major* (direita) expondo as sementes envoltas em arilo alaranjado.

Fonte: Fotos do autor.

Os teores de zeaxantina determinados nos arilos das sementes das duas espécies de *clusia* foram ainda superiores aos das demais espécies avaliadas.

Para a *Clusia major*, o teor de carotenoides totais nos arilos foi de 511 μ g/g, sendo destes 297 μ g/g de zeaxantina. Para a *Clusia fluminensis*, o teor de carotenoides totais foi de 967 μ g/g e o de zeaxantina 823 μ g/g.

O teor de zeaxantina encontrado nos arilos da *C. major* foi 74 vezes superior ao teor encontrados no grão de milho verde *in natura*, enquanto o teor na *C. fluminensis* chegou a 206 vezes este valor.

Na Figura 69 da página 96 são apresentados os cromatogramas e espectros obtidos com a injeção dos extratos saponificados dos arilos das duas espécies.

Apesar do elevado teor de zeaxantina encontrado nos arilos das duas espécies de *Clusias*, não há relatos do consumo destes frutos pelo homem. No entanto, os arilos e sementes não parecerem apresentar toxicidade, fato reforçado pelo fato de serem avidamente consumidos por aves, o que inclusive torna difícil a obtenção de frutos íntegros na natureza.

Os arilos dos frutos das *Clusias* estudadas podem ser considerados excelentes fontes para isolamento de zeaxantina em pequena escala, como a necessária para o preparo de padrão analítico, porém, a pouca quantidade de arilos, em relação à massa do fruto, e sua sazonalidade, desencorajam seu uso como fonte alimentar de zeaxantina.

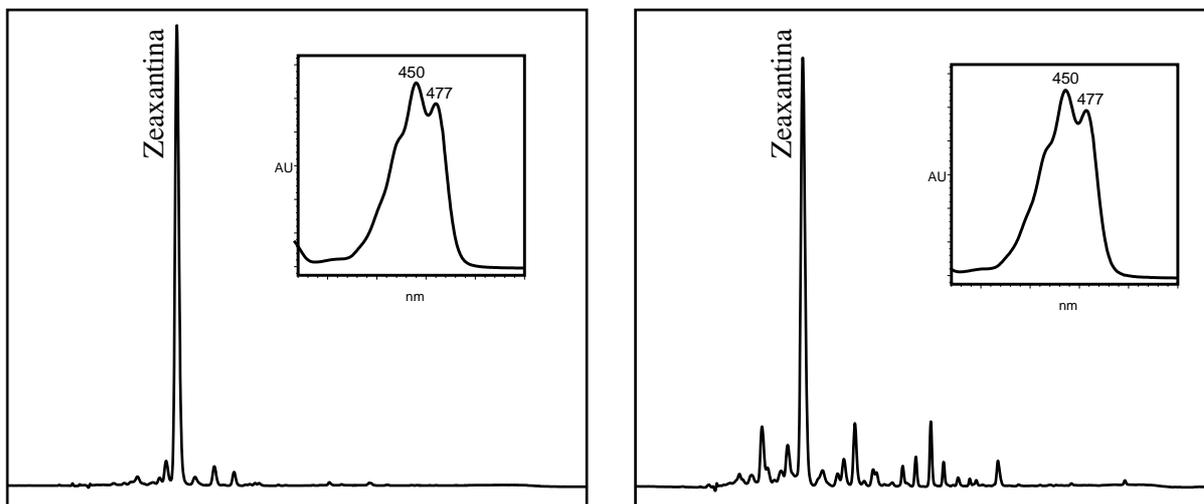


Figura 69 – Cromatogramas e espectros dos extratos saponificados dos arilos dos frutos de *Clusia fluminensis* (esquerda) e *Clusia major* (direita).

4.1.3.5 Comparação entre teores de carotenoides das fontes avaliadas e as de referência

Recentemente introduzido no Brasil, os frutos desidratados de Goji (*Lycium barbarum*) são descritos como a maior fonte natural de zeaxantina (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011). A análise de carotenoides desse fruto foi realizada a fim de se comparar os teores de zeaxantina com os teores obtidos nas matrizes estudadas neste trabalho.

Além do Goji, foram também comparados os teores de zeaxantina da laranjinha de jardim (*Solanum pseudocapsicum*)¹⁵ e os teores de licopeno das novas fontes agora relatadas, os resultados estão na Tabela 8 da página 97.

¹⁵ A presença de altos teores de zeaxantina nos frutos de Laranjinha de Jardim (*Solanum pseudocapsicum*) foi relatado anteriormente pelo autor: PACHECO, 2009, p.65.

Tabela 8 – Teores de zeaxantina e licopeno nas matrizes estudadas comparadas às relatadas como ricas nestes carotenoides.

Matriz	Parte utilizada	Zeaxantina		Licopeno		Referência
		µg/g		µg/g		
Milho	Grãos verdes	4,0	-	-	-	a
Milho	Farinha (fubá)	9,4	(+2,4x)	-	-	a
Tomate	Polpa do fruto	-	-	35	-	a
Goji	Fruto desidratado	1480	(+370x)	-	-	b
Melão-de-São-Caetano	Arilo da semente	-	-	560	(+16x)	c
Melão-de-São-Caetano	Pericarpo do fruto	68	(+17x)	0,7	(-50x)	b
Melão-de-São-Caetano	Pericarpo em pó desidratado	508	(+127x)	60	(+1,7x)	b
Melão-de-São-Caetano	Arilo em pó desidratado	-	-	1722	(+49x)	b
Laranjinha de jardim	Polpa do fruto	114	(+29x)	-	-	c
<i>Clusia major</i>	Arilo da semente	297	(+74x)	-	-	b
<i>Clusia fluminensis</i>	Arilo da semente	823	(+206x)	-	-	b
<i>Eugenia punicifolia</i>	Polpa do fruto	31	(+8x)	550	(+16x)	b
Caferana	Polpa do fruto	-	-	360	(+10x)	b

Valores entre parêntesis representam o número de vezes que a concentração do carotenoide na matriz é maior ou menor que na matriz referência, que é o milho para a zeaxantina e o tomate para o licopeno.

Fonte: **a-** Rodriguez-Amaya *et al.* (2008); **b-** dados do autor e **c-** Pacheco (2009).

Como era de se esperar, os teores de carotenoides nas matrizes desidratadas, Goji e os pós preparados com de Melão-de-São-Caetano, foram muito superiores aos das matrizes *in natura*. A retirada de água, que representa 70 a 90% da massa total, promove uma concentração dos demais constituintes.

Devido à dificuldade de se encontrar frutos de Goji *in natura*, não foi possível determinar qual fruto dos estudados apresenta o maior valor para a zeaxantina, no entanto, destacaram-se com os teores mais elevados: os arilos das sementes da *C. fluminensis* e da *C. major*, os frutos da laranjinha de jardim e o pericarpo dos frutos de Melão-de-São-Caetano.

Em relação ao teores de licopeno, destacaram-se: as polpas dos frutos da *E. punicifolia*, e da caferana e os arilos das sementes do Melão-de-São-Caetano.

4.1.4 Melhoria do método analítico de bixina e norbixina

A Figura 70 apresenta o cromatograma do extrato de sementes de urucum obtido por Tocchini e Mercadante (2001), que foi o método de partida para a realização da melhoria, e o cromatograma reproduzido inicialmente no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, tendo como única modificação a utilização de uma coluna cromatográfica com tamanho de partícula maior, mais curta e de fabricante diferente.

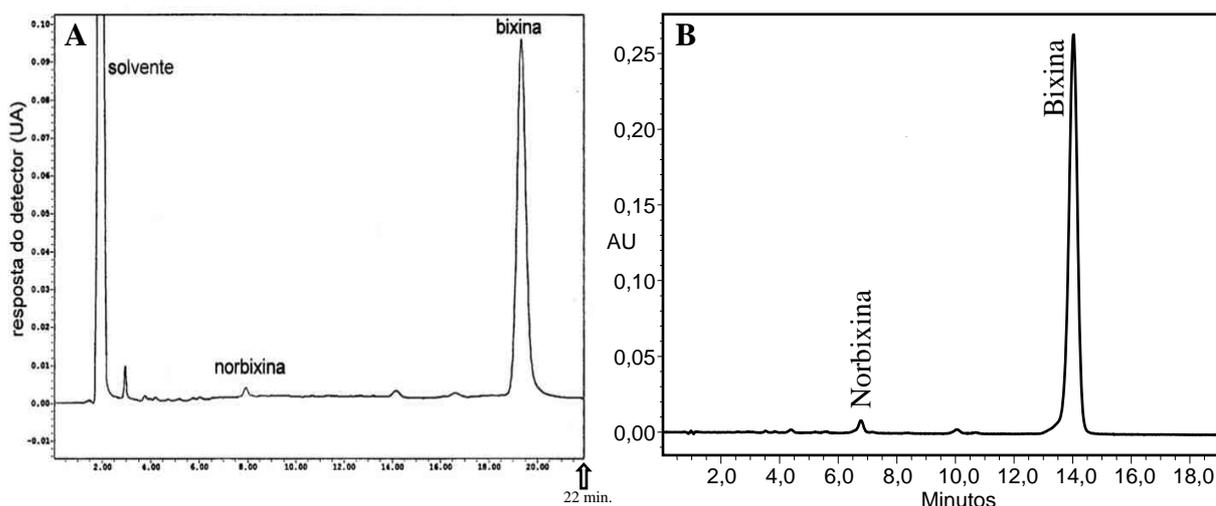


Figura 70 - Cromatograma de extrato de sementes de urucum obtidos por (A) Tocchini e Mercadante (2001) e (B) reproduzido no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Fonte: Cromatograma A: TOCCHINI, 2001, p.313.

Apesar da utilização de uma coluna cromatográfica com tamanho de partícula maior, 3,5 μ m contra 3,0 μ m, usada no método da referência, o fato da coluna ser mais curta, 100 contra 150mm, possibilitou a obtenção de uma redução do tempo de retenção para a bixina. O tempo de retenção foi reduzido de aproximadamente 19 para 14 minutos. Deste modo, uma redução de 7 minutos no tempo de análise foi conseguido apenas com a escolha da coluna cromatográfica, sem prejudicar a separação dos analitos.

A fim de reduzir ainda mais o tempo de análise e avaliar o fator de resposta dos analitos, foram propostas modificações no método, foram elas: a utilização de eluição em modo gradiente e o uso de aquecimento brando na coluna (30°C). A Figura 71 da página 99 apresenta o cromatograma obtido após estas modificações.

O gradiente proposto consistiu na utilização de duas fases móveis: **A**-água/ácido acético 98:2 e **B**-acetonitrila. A proporção inicial destas fases (**A**:**B**) foi de 35:65, indo para 10:90 em 5 minutos e retornando à condição inicial em 5,05 minutos. Com a utilização deste gradiente, o tempo total da corrida cromatográfica foi reduzido para 9 minutos.

Nas condições propostas, a bixina apresentou um tempo de retenção de 6,5 minutos, o que representa uma redução de 13,5 minutos se comparado à metodologia descrita na literatura.

Além disto, os picos mostraram-se muito mais intensos, principalmente para a norbixina. Este fato pode ser explicado pelo estreitamento da base do pico, promovido pelo menor tempo de retenção e conseqüentemente menor difusão dos analitos através da fase

estacionária. Este ganho na intensidade dos picos reflete diretamente na sensibilidade do método, pois menores concentrações (picos) podem ser visualizados e integrados.

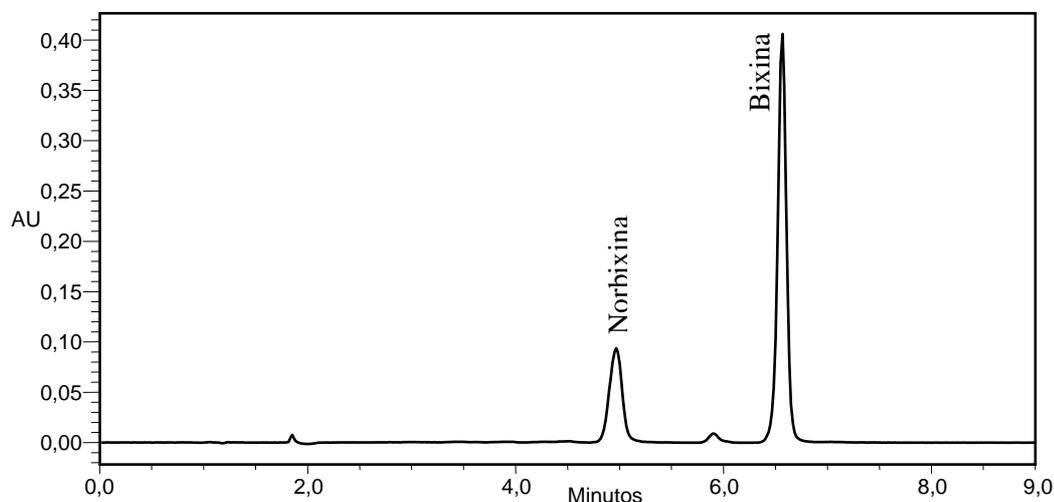


Figura 71 - Cromatograma depois das melhorias do método de separação de bixina e norbixina, eluição em modo gradiente e aquecimento da coluna a 30°C.

A redução no tempo total de análise cromatográfica, em relação ao método proposto por Tocchini e Mercadante (2001), foi de 53% com as melhorias propostas.

4.1.5 Implantação do método de análise de ácidos fenólicos

Após a adaptação do método de Mattila e Kumpulainen (2002) para a coluna com partículas de 2,4µm, e ajustes no gradiente de eluição, conforme Tabela 3 da página 73, o cromatograma obtido para a mistura dos padrões no método implantado é apresentado na Figura 72 da página 100. Os espectros de absorção de cada ácido foram extraídos na faixa de comprimento de onda de 210 a 400nm (Figura 72 página 100).

Com as modificações no método cromatográfico foi possível reduzir o tempo de análise de 45 para 28 minutos, um ganho de 38%.

Mesmo com essa redução no tempo de análise, não houve perda de resolução, ao contrário, a separação dos ácidos ferrúlico e sinápico no método proposto foi plena, enquanto no método original havia coeluição¹⁶ em pico único. A separação dos dois ácidos está destacada com um círculo na Figura 72 da página 100.

Todas as curvas analíticas preparadas foram lineares na faixa de trabalho escolhida (100 a 2.200µg/mL).

¹⁶ O cromatograma com a coeluição dos dois ácidos no método original é apresentado por Mattila e Kumpulainen (2002), p. 3664.

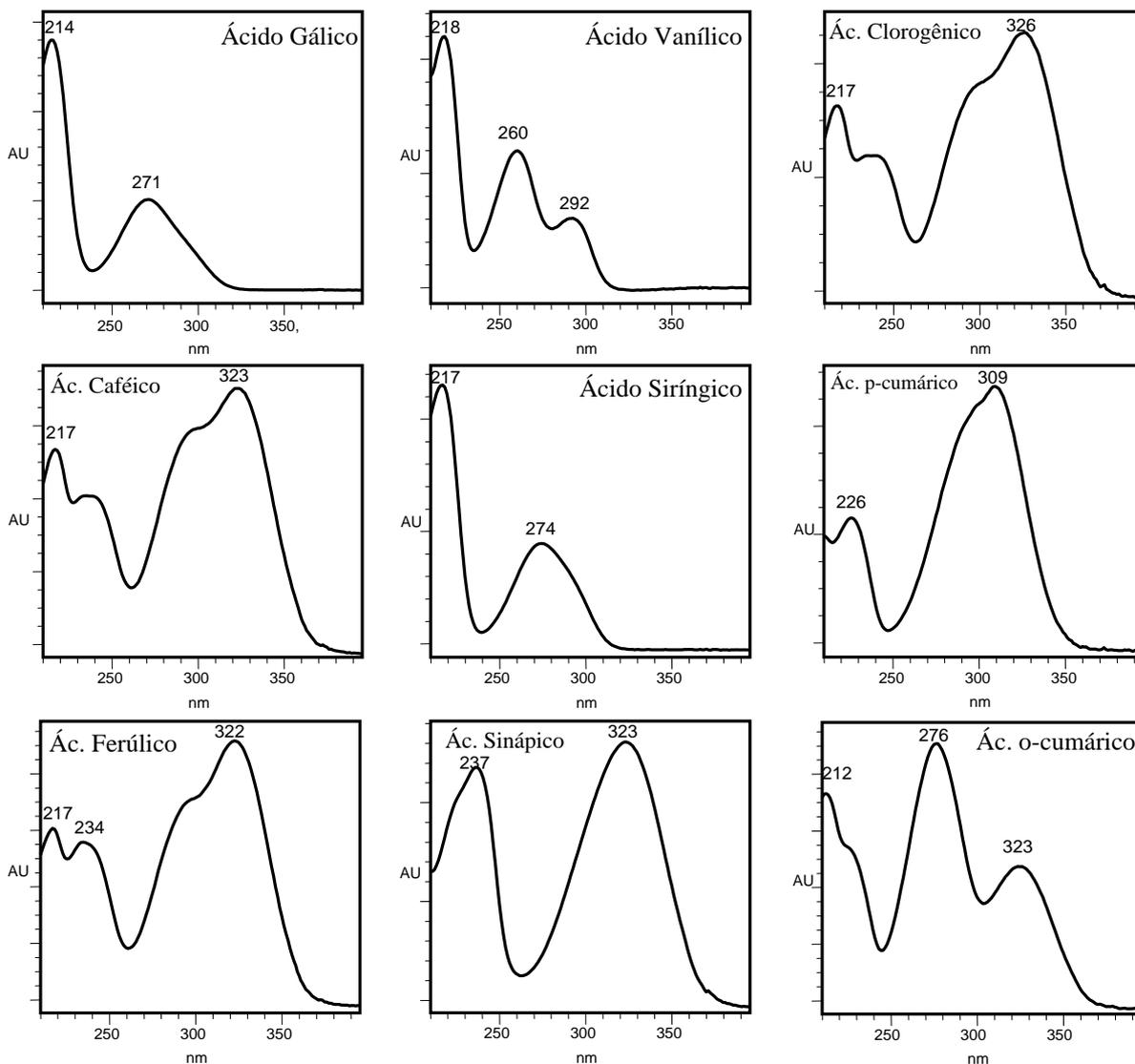
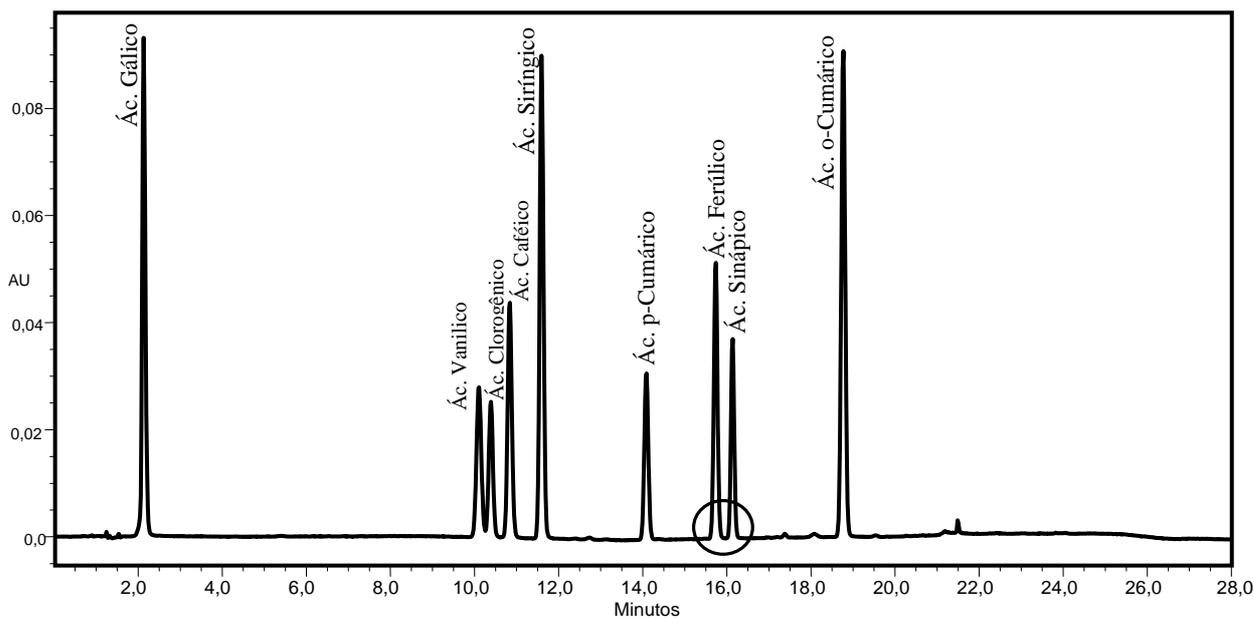


Figura 72 - Cromatograma e espectros de uma mistura de padrões de ácidos fenólicos após implantação e melhorias no método cromatográfico, destacando com o círculo a resolução para os ácidos ferúlico e sinápico.

Após as melhorias propostas a seletividade do método cromatográfico, ou seja, a capacidade de identificação e separação das substâncias de interesse dos interferentes das matrizes, foi avaliada com a análise de um extrato preparado a partir de pó de café, a Figura 73 apresenta o cromatograma obtido com a identificação dos ácidos fenólicos detectados.

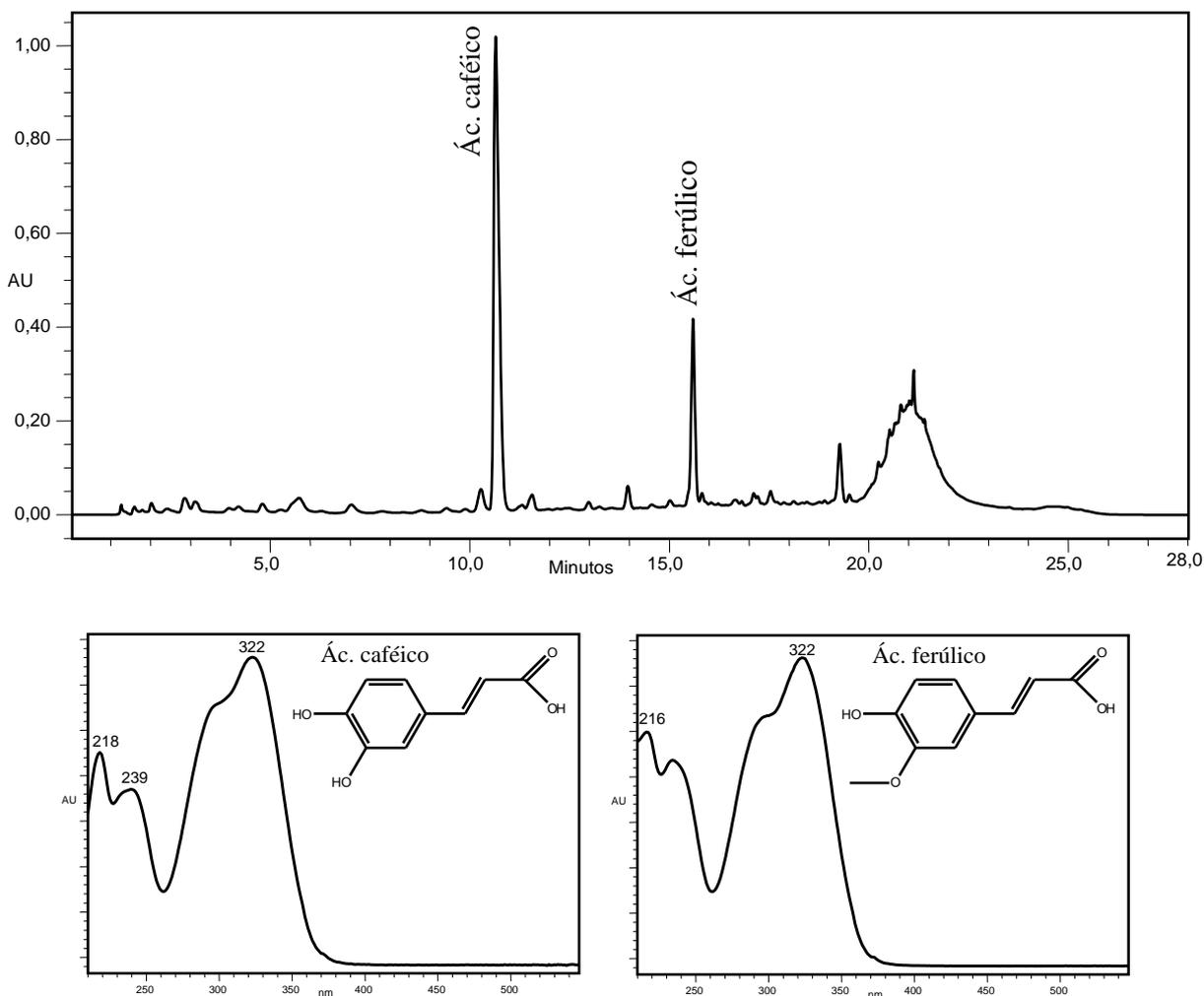


Figura 73 – Cromatograma, espectros e estruturas dos ácidos fenólicos identificados em extrato de pó de café.

A identificação dos dois ácidos encontrados foi através da comparação dos tempos de retenção e espectros com os obtidos na injeção dos padrões (Figura 72 página 100).

Apesar da grande similaridade entre os espectros de ambas as substâncias, fruto da presença do mesmo cromóforo nas duas moléculas, a existência de uma metila no oxigênio do carbono 3 do ácido ferúlico (Figura 73) é suficiente para um incremento de aproximadamente cinco minutos no tempo de retenção em comparação com o ácido caféico, o que torna a identificação dos dois ácidos inequívoca.

Visualmente nenhum interferente proveniente da matriz apresentou coeluição, do mesmo modo, a comparação dos espectros das substâncias identificadas com os espectros dos padrões se mostrou sem alterações em seu perfil (pureza de pico), com isso, pode-se dizer que o método cromatográfico proposto foi seletivo.

4.1.6 Purificação de isoflavonas

A utilização crescente da soja e seus derivados, aliado à popularização da importância e uso das isoflavonas, metabólitos secundários presentes em alta concentração no grão de soja, acabaram por gerar uma demanda por um método analítico capaz de detectar as isoflavonas na soja e seus produtos¹⁷.

Como matriz para o isolamento e preparo dos padrões das isoflavonas, fez-se a utilização de grãos integrais de soja. A Figura 74 apresenta o perfil cromatográfico das isoflavonas encontradas no extrato obtido. Apesar de ser a fonte relatada com maior teores destes flavonoides, o perfil é bastante desigual em termos de concentração das isoflavonas. As formas agliconas, picos 4, 5 e 6, estão presentes em pequena quantidade ou até mesmo ausente, como no caso da genisteína. Desta forma, o grão de soja integral não se apresentou como uma boa fonte para a obtenção das seis isoflavonas necessárias.

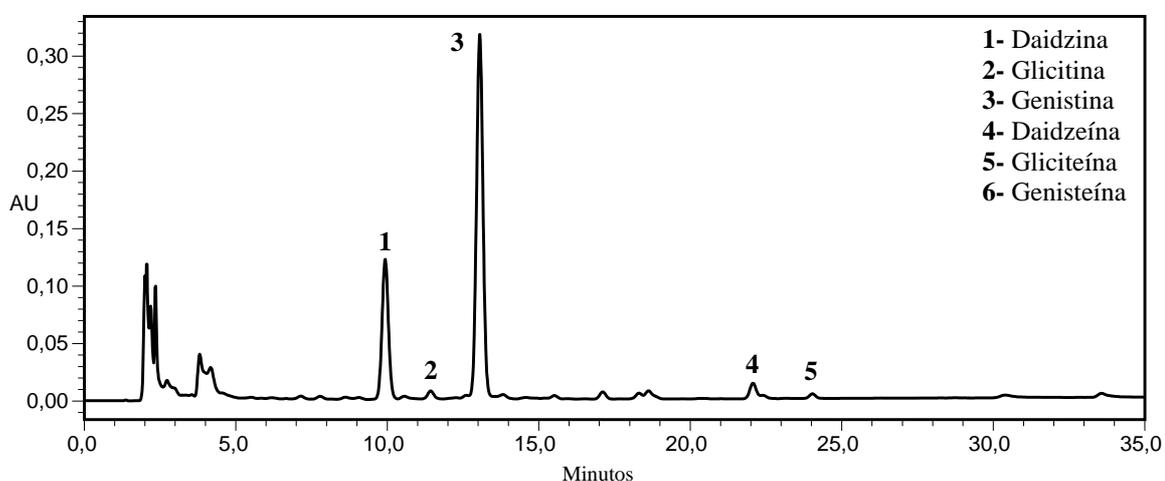


Figura 74 – Perfil cromatográfico de isoflavonas do extrato de grãos soja integral.

Por estarem em maior concentração no gérmen da soja, estes foram separados manualmente dos grãos e a Figura 75 A da página 103 apresenta o perfil cromatográfico das isoflavonas encontradas no extrato obtido. Neste caso, todas as isoflavonas de interesse foram encontradas, sendo a concentração das formas glicosídicas bastante elevada e das agliconas muito baixas, esta diferença nas concentrações não favorece o isolamento.

Com a realização de uma hidrólise ácida, em uma alíquota de 200mL do extrato de gérmen, promoveu-se a alteração do perfil cromatográfico (Figura 75 B página 103). É possível notar que praticamente a totalidade das isoflavonas glicosídicas foram convertidas nas suas formas agliconas. Apesar da eficiência da hidrólise das isoflavonas, o extrato se tornou pobre nas formas glicosídicas, ainda inviabilizando a obtenção das seis isoflavonas de interesse.

A solução encontrada, para a obtenção das seis isoflavonas de interesse em um mesmo extrato, foi a simples mistura de alíquotas de igual volume dos extratos de gérmen de soja com e sem hidrólise. O perfil cromatográfico da mistura assim obtida apresentou todas as isoflavonas de interesse em concentrações elevadas e semelhantes (Figura 75 C página 103).

De posse do extrato rico nas seis isoflavonas procedeu-se o isolamento das substâncias. Para isso, o extrato foi injetado sucessivamente no método analítico e a coleta dos picos separados foi automatizada com a utilização da válvula Rheodyne[®], conforme item 3.2.2 da página 67.

¹⁷A implantação da análise de isoflavonas foi resposta à demanda da pesquisadora Ilana Felberg da Embrapa Agroindústria de Alimentos, os resultados foram publicados em sua tese (FELBERG, 2010).

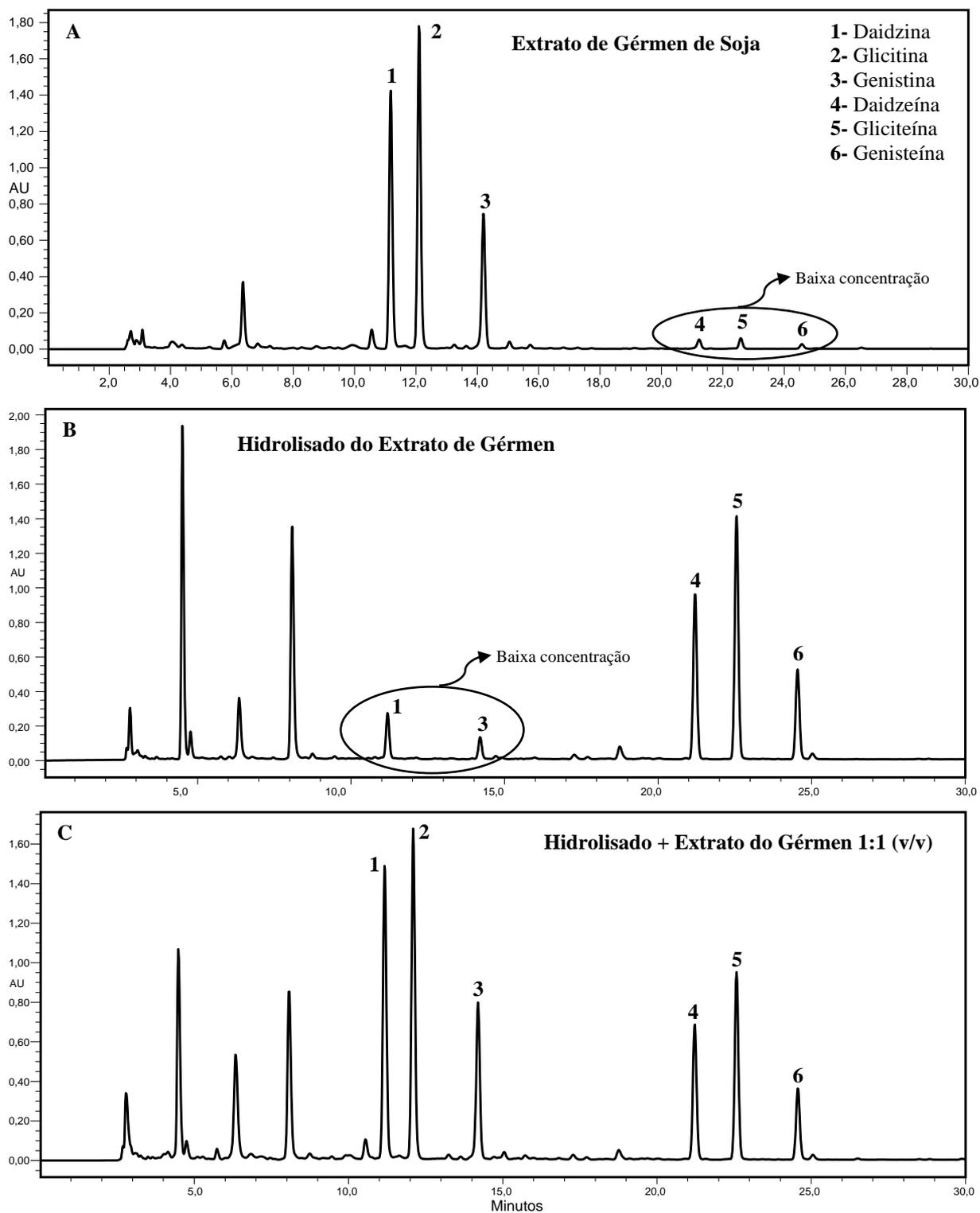


Figura 75 – Perfil cromatográfico de isoflavonas do extrato de gérmen de soja antes (A) e após hidrólise ácida (B) e da mistura de volumes iguais dos dois extratos (C).

Todas as isoflavonas assim isoladas apresentaram pureza superior a 99%. A Figura 76 apresenta os cromatogramas obtidos para os três primeiros picos isolados: daidzina (99,85%), glicitina (99,94%) e genistina (99,95%).

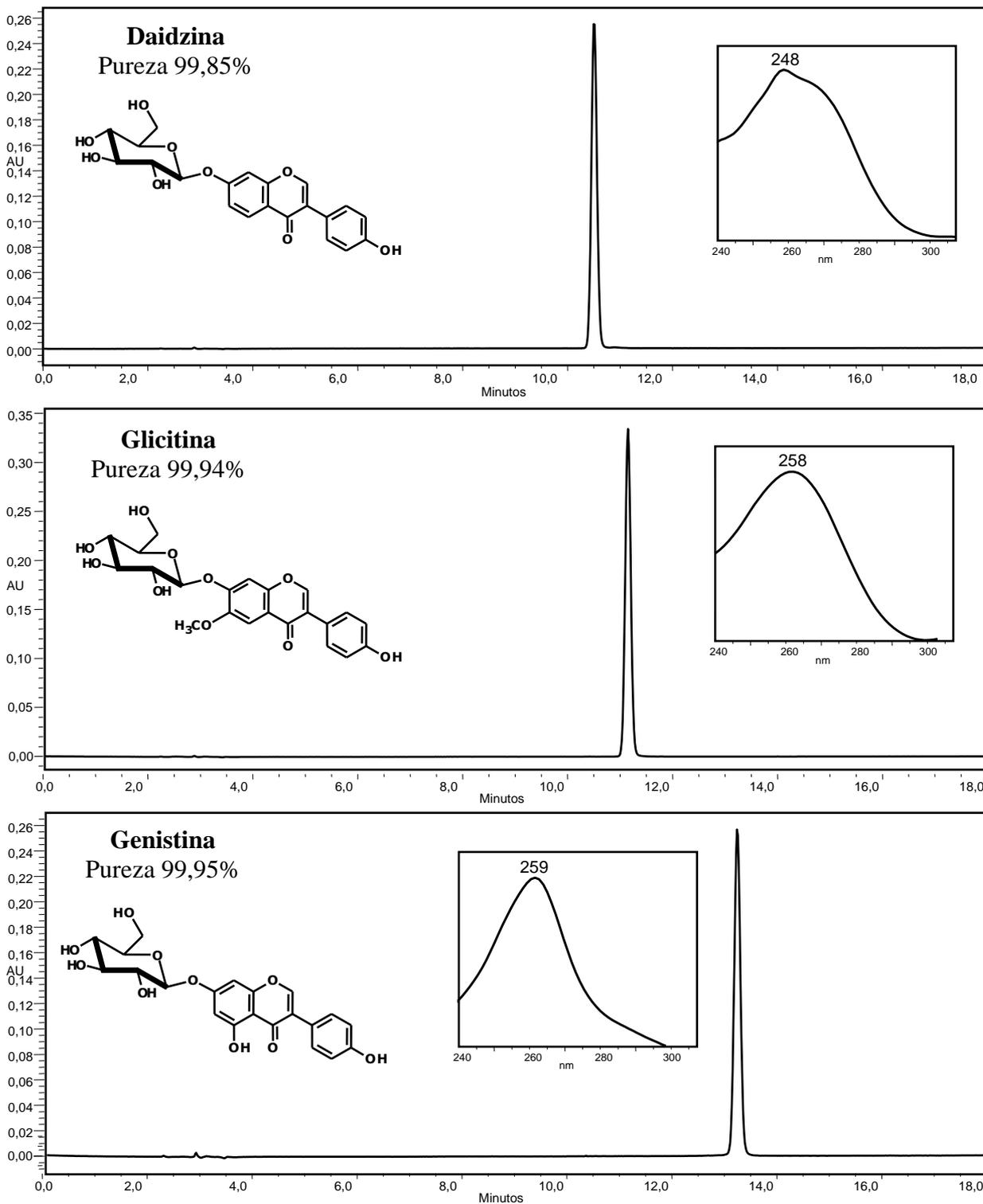


Figura 76 - Isoflavonas glicosídicas isoladas a partir de gérmen de soja.

Após a obtenção das seis isoflavonas de interesse, as soluções individuais foram quantificadas espectrofotometricamente e então misturadas de modo a obter proporção de concentração semelhante à encontrada em amostras de soja e seus produtos. A Figura 77 apresenta o cromatograma obtido com a injeção da mistura de padrões preparada, o método cromatográfico é o sugerido por Klump *et al.* (2001).

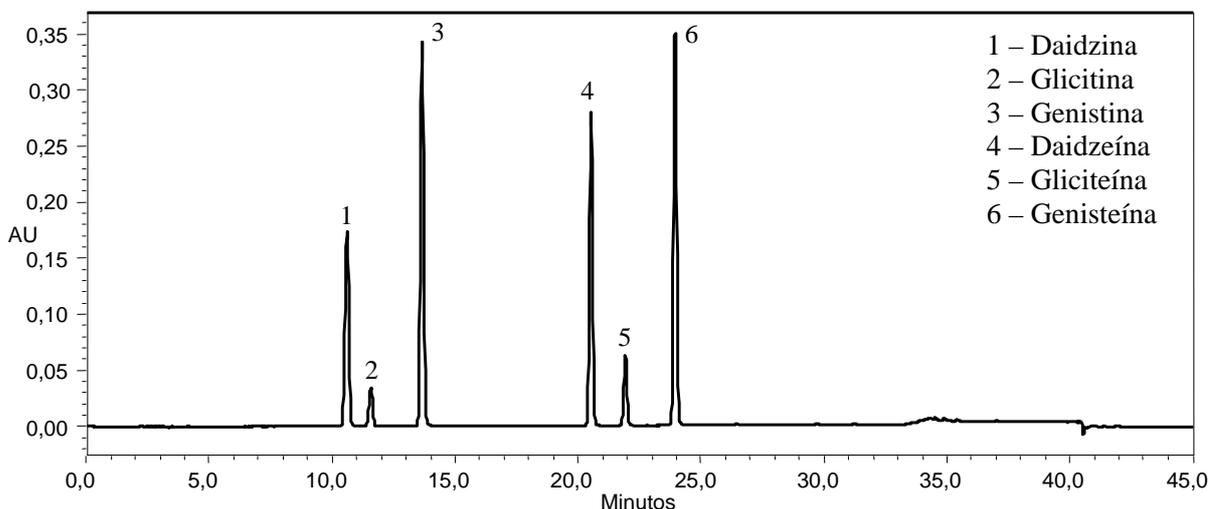


Figura 77 – Cromatograma da mistura das seis isoflavonas isoladas por CLAE no método analítico de (Klump *et al.* (2001)).

4.1.6.1 Aplicação do método para detecção de isoflavonas em carnes

A proposta para a detecção de fraude pela adição de proteína de soja em carnes¹⁸ foi avaliada com a análise das amostras de lombo suíno preparadas. As isoflavonas das amostras foram extraídas sem modificações na metodologia original, os cromatogramas da Figura 78 mostram a comparação entre os extratos da amostra controle e a amostra com adição de 1,5% de proteína de soja (Figura 78).

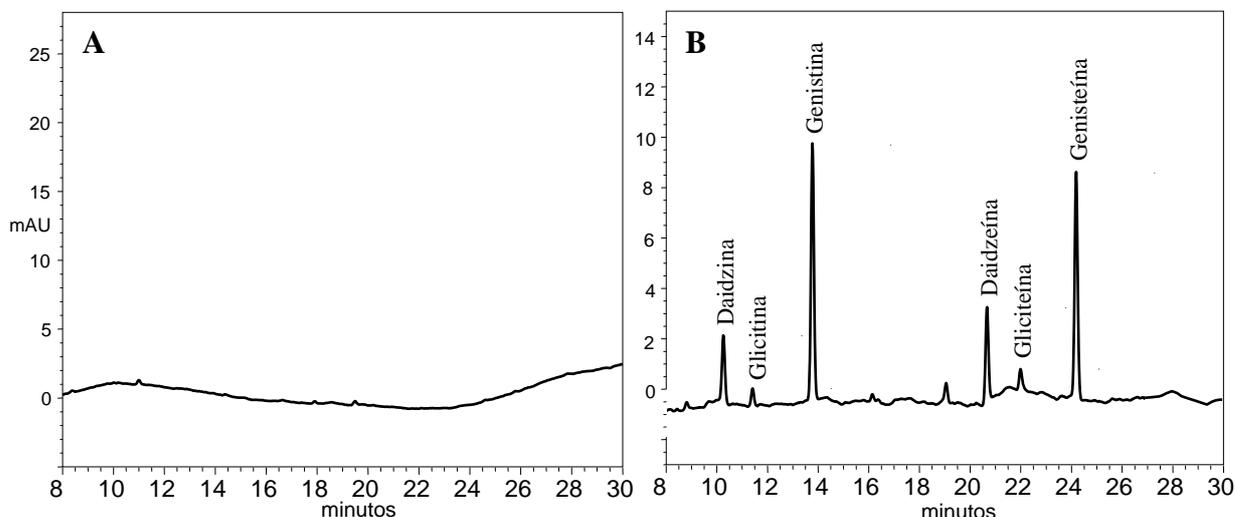


Figura 78 - Cromatograma do extrato de lombo suíno sem injeção de salmoura (A) e com injeção de salmoura adicionada de 1,5% de proteína de soja (B).

¹⁸A aplicação da análise de isoflavonas para a detecção de fraude pela adição de soja em carnes foi uma resposta à demanda do D.Sc. Heitor Daguer do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, os resultados foram publicados em coautoria (DAGUER *et al.*, 2010).

O método de determinação de isoflavonas, sem nenhuma adaptação, se mostrou sensível e eficiente na detecção da presença de proteína de soja em carne, o que, por legislação, pode comprovar fraude.

Apesar do método ter sido capaz de detectar as seis isoflavonas da soja na carne preparada com 1,5% de proteína de soja, sugere-se que a concentração da genistina seja utilizada como marcador, por ser esta a isoflavona com maior concentração (Figura 78 **B** página 105), isto garantiria a maior sensibilidade possível para o método proposto.

O método de determinação de isoflavonas por CLAE, para a detecção de proteínas vegetais em produtos cárneos, é certamente mais rápido, sensível e com menor probabilidade de interferência causada pela matriz em comparação com outras técnicas analíticas, como a eletroforese por exemplo.

4.1.6.2 Melhoria do método de análise de isoflavonas

Com o propósito de melhorar o método cromatográfico, em especial na questão relacionada à redução do tempo de análise, foi avaliada a capacidade de separação das isoflavonas de uma coluna com partícula inferior a $3\mu\text{m}$ ¹⁹.

A composição da fase móvel, bem como as rampas originais de gradiente foram mantidas, modificações foram feitas nos tempos do gradiente e principalmente no fluxo, que foi estabelecido em 0,45mL/min. A Tabela 9 apresenta as condições finais após as melhorias do método, as fases móveis são **A**-água:metanol:ácido acético (88:10:2 v/v) e **B**-metanol:ácido acético (98:2 v/v).

Tabela 9 - Gradiente de eluição para separação rápida de isoflavonas.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
Inicial	93	7
0,1	93	7
5,0	60	40
5,3	60	40
5,5	20	80
7,0	20	80
7,1	93	7
12,0	93	7

Fase **A**: Água/Metanol/Ácido acético (88:10:2 v/v) e Fase **B**: Metanol/Ácido acético (98:2 v/v).

A Figura 79 da página 107 apresenta o cromatograma da mistura dos padrões das seis isoflavonas isoladas anteriormente nas condições cromatográficas do método rápido proposto. A escala de tempo foi mantida a mesma que no método original para melhor comparação, o tempo de corrida para o novo método foi de 12 minutos, mas com efetiva separação das isoflavonas em apenas 7 minutos.

Por se tratar de um método originalmente de fluxo relativamente alto, 1,1 a 1,3mL/min, e ainda apresentar um tempo de corrida elevado, 45 minutos, o consumo de fase móvel e o tempo de corrida foram as principais melhorias atingidas com o método proposto. Uma comparação entre os dois métodos é apresentada na Tabela 10 da página 107.

¹⁹ A melhoria do método cromatográfico de isoflavonas foi uma parceria com a aluna Carolina Passos da Cunha, cujo tema fez parte de sua dissertação (CUNHA, 2013).

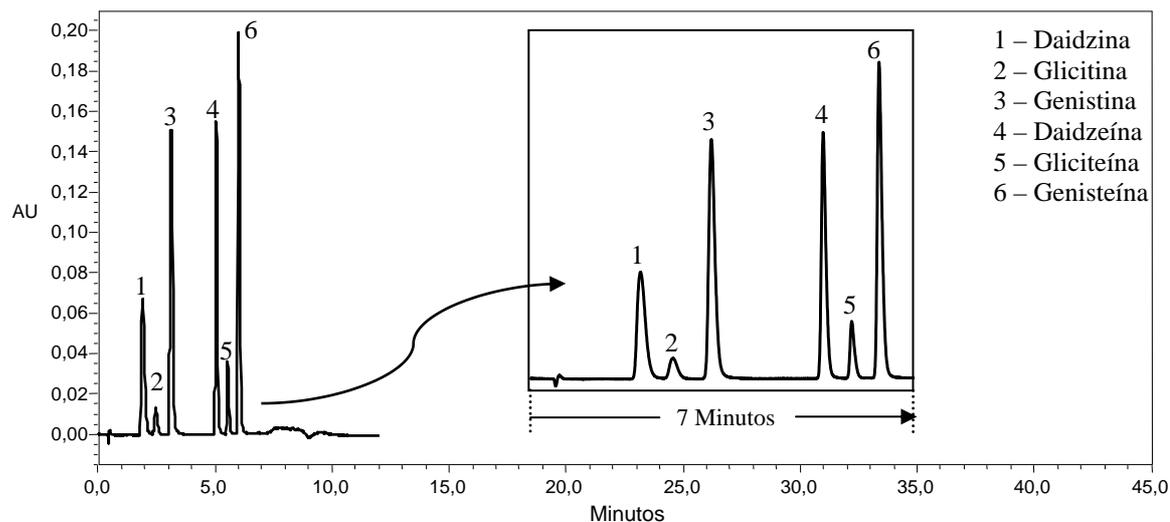


Figura 79 - Cromatograma da separação de uma mistura de padrões de isoflavonas em coluna com tamanho de partícula de 2,6 μ m. A escala de tempo foi mantida a mesma do método original, em destaque ampliação para visualização da separação dos analitos.

Tabela 10 – Comparação entre método de separação de isoflavonas original de Klump et al. (2001) e o proposto.

Condição Cromatográfica	Original	Proposta	Redução (%)
Fluxo (mL/min)	1,1 a 1,3	0,45	59
Pressão (psi)	~2600	~2800	-
Fase móvel (mL)	49,5	5,4	89
Tempo (min)	45	12	73

A pressão do sistema cromatográfico é função da resistência apresentada pela fase estacionária à passagem da fase móvel, ao se reduzir o tamanho da partícula da fase estacionária, a pressão do sistema sofre considerável incremento. Ao se trabalhar com pressões elevadas, há um aumento no desgaste de todas as partes do equipamento expostas à pressão, em especial as partes da bomba analítica. Pressões elevadas acarretam desgaste precoce dos selos dos pistões e dos próprios pistões, aumentando os custos de manutenção do equipamento. Esta foi a maior preocupação ao se utilizar a coluna de 2,6 μ m de tamanho de partícula. No entanto, ao se reduzir drasticamente o fluxo da análise, de 1,1 para 0,45mL/min, a pressão do sistema acabou ficando equivalente nos dois métodos.

A redução do fluxo ainda foi a responsável pela redução de 89% no consumo de solventes (fase móvel), e, conseqüentemente, mesma porcentagem de redução na geração de resíduos. Este foi o maior fator impactante na redução do custo da análise, haja visto que todos os resíduos orgânicos gerados nas análises são dispensados através de empresa especializada, e o valor pago à empresa é pelo volume dispensado.

Outro fator importante constatado com a implantação do método rápido é em relação ao detector utilizado, pois este apresentava taxa padrão de aquisição de dados, ou seja, uma

leitura por segundo. Esta taxa se mostrou muito baixa e teve que ser aumentada para dez aquisições por segundo, máximo permitido para este detector, isto por conta da maior velocidade de saída dos picos no novo método. Desta maneira, garantiram-se vários pontos de leitura ao longo do pico, e, conseqüentemente, maior reprodutibilidade na sua integração.

O tempo de equilíbrio do sistema entre uma injeção e outra foi o maior fator limitante na melhoria da análise rápida proposta, devido ao fluxo baixo e à utilização de eluição em modo gradiente, o tempo de espera foi praticamente a metade do tempo total da corrida cromatográfica. Nessas condições, seria interessante um estudo mais aprofundado na tentativa de se estabelecer uma eluição isocrática para uma redução ainda maior no tempo de análise.

4.1.7 Purificação de retinol

A escolha do fígado bovino como matriz para obtenção do retinol através de coleta manual se mostrou bastante eficiente, a Figura 80 apresenta o cromatograma do retinol assim extraído e purificado. A pureza cromatográfica obtida foi de 98,7%.

O método cromatográfico para análise de carotenoides se mostrou capaz de separar o retinol dos demais constituintes das matrizes, bem como dos carotenoides. O comprimento de onda para extração dos cromatogramas foi em 323nm, que é o máximo de absorção para o retinol.

A quantidade coletada de retinol foi suficiente para a sua caracterização, quantificação espectrofotométrica e para a construção de curva analítica. O método então foi utilizado para atender à demanda de determinação de retinol em amostras de leite e derivados²⁰.

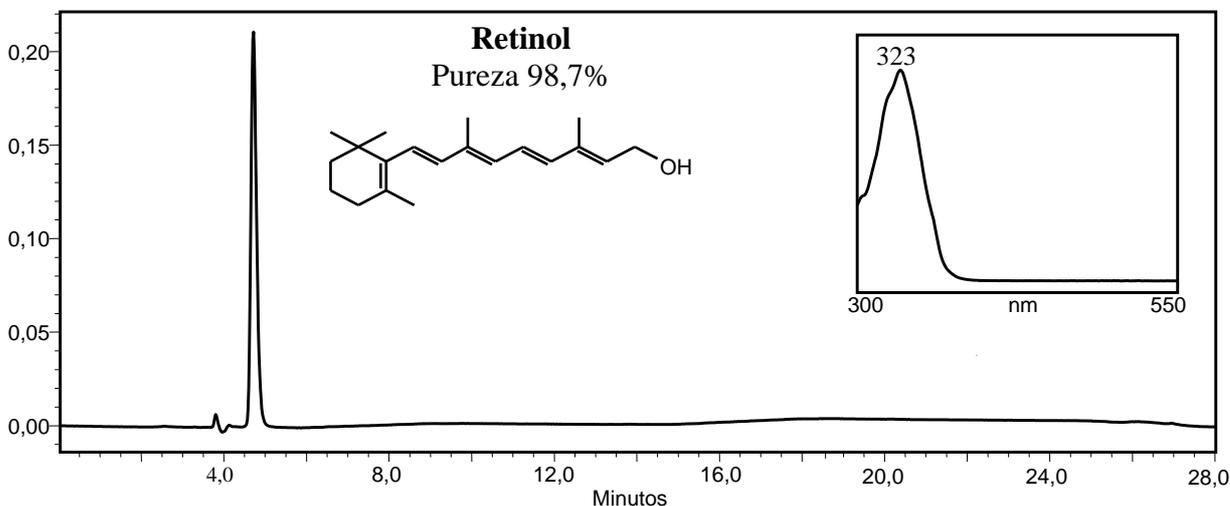


Figura 80 - Cromatograma, estrutura e espectro do padrão de retinol obtido por coleta manual de injeções de extrato de fígado bovino.

²⁰ O isolamento do padrão de retinol e a implantação do método cromatográfico foi resposta à demanda da aluna Sabrina da Silva Dias, cujo tema de tese foi a avaliação de retinol em leite e derivados (DIAS, 2012).

4.2 Análise de aminoácidos e utilização do método de derivatização com AQC

A Figura 81 apresenta o cromatograma da mistura com 17 padrões (PIERCE®) derivatizados e analisados utilizando o *Kit* AccQ.Tag® da Waters®. As condições cromatográficas foram as recomendadas pelo fabricante e a coluna e eluentes são os fornecidos no *Kit*. A separação dos 17 aminoácidos, mais o derivado de amônia, é bastante complexa, o gradiente utilizado apresenta várias rampas de eluição ao longo da corrida e a concentração dos sais e pH das fases móveis influenciam muito na separação. Por esta razão, a aquisição de todo o material necessário em forma de *Kit* facilita o sucesso da análise.

No entanto, é possível preparar as fases móveis no laboratório, para isso, cuidado especial deve ser tomado quanto à qualidade dos reagentes utilizados e no seu preparo. Diferenças pequenas nas concentrações dos sais e de apenas 0,05 no valor do pH podem alterar a separação e promover coeluições. A coluna cromatográfica deve ter no mínimo 10.000 pratos teóricos, caso contrário a separação não é completa.

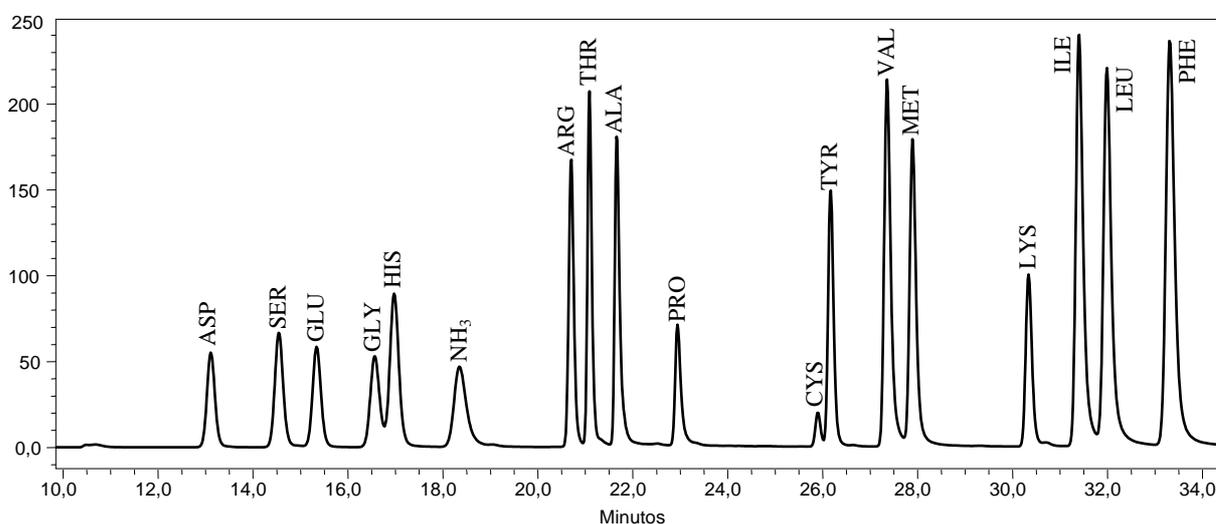


Figura 81 - Separação da mistura de padrões de 17 aminoácidos derivatizados com AQC, realizada com a coluna fornecida no *Kit* da Waters®, com 4,0µm de tamanho de partícula.

4.2.1 Melhoria da separação dos derivados AQC de aminoácidos

Pela complexidade do método cromatográfico de separação dos derivados AQC dos aminoácidos, e pelo ótimo resultado obtido com o *Kit* AccQ.Tag®, não existem muitos estímulos para se tentar melhorias. Mesmo assim, foi testada a utilização de uma coluna alternativa, com tamanho de partícula de 2,4µm, inferior aos 4µm da coluna fornecida no *kit*.

Foi ainda avaliada a formulação da fase móvel A no laboratório ao invés de adquiri-la pronta no *kit* comercializado. A seguir seguem os resultados obtidos com estas duas modificações.

4.2.1.1 Separação de derivados de aminoácidos em coluna com partícula de 2,4 μ m

A Figura 82 apresenta o cromatograma obtido com a coluna de 2,4 μ m na separação da mesma mistura de padrões anteriormente separadas na coluna original do método de aminoácidos. Não foram feitas quaisquer modificação no gradiente de eluição.

A separação obtida com a coluna proposta é sensivelmente melhor, em especial na separação das seguintes duplas de picos vicinais: GLY/HIS, CYS/TYR e ILE/LEU.

A presença de um pico não identificado, anterior ao pico da GLY, e destacado com o círculo no cromatograma da Figura 82, que não era visível na separação do método original (Figura 81 página 109), corrobora com a afirmação de que colunas com partículas menores apresentam maior resolução e são capazes de separar mais facilmente interferentes presentes nas amostras. Este fato pode ser determinante na simplificação do preparo das amostras, pois com as separações dos interferentes, anteriormente coeluídos com os picos de interesse, pode não se tornar necessária a sua prévia remoção.

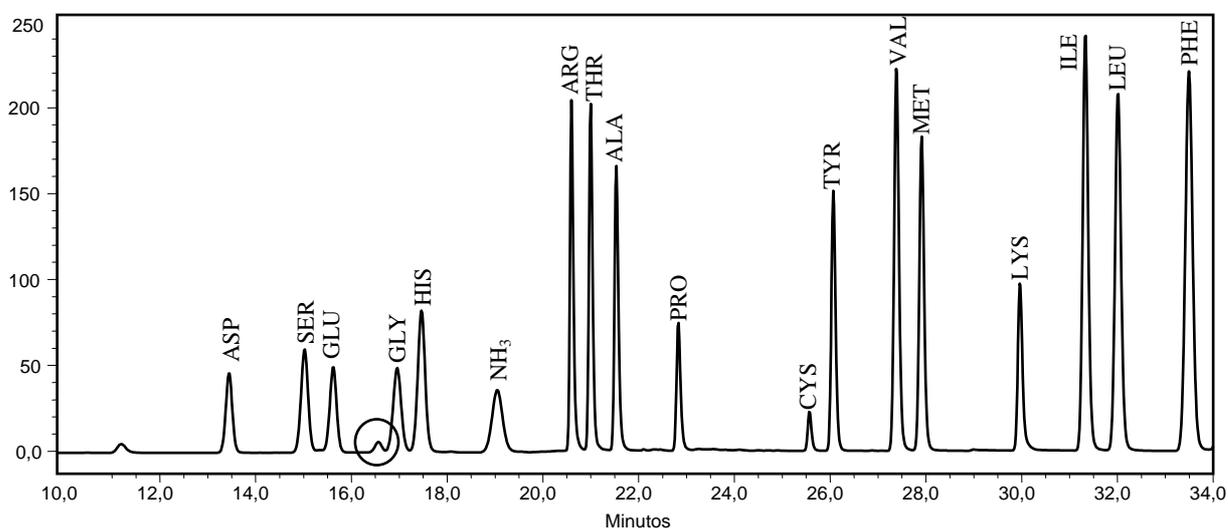


Figura 82 - Separação de mistura de padrões de aminoácidos derivatizados com AQC em coluna com partícula de 2,4 μ m.

Apesar de ser cinco centímetros menor que a coluna original, 100 contra 150mm, a coluna com partícula de 2,4 μ m se mostrou equivalente com a coluna maior na separação, pois não houve a necessidade de adaptação do gradiente de eluição pré-estabelecido. Desta maneira, métodos estabelecidos para as colunas maiores, em comprimento e tamanho de partículas, podem ser facilmente adaptados para as colunas de partículas menores, com grande ganho de resolução, a adaptação consiste unicamente na troca da coluna.

4.2.1.2 Preparo do tampão acetato para a análise de aminoácidos

O preparo do tampão acetato no laboratório, utilizado como fase móvel A no método de separação dos aminoácidos, apesar de relativamente simples, se mostrou muito crítico para a separação. Pequenas alterações na concentração do acetato de sódio, e também no pH da solução final, promoveram grandes variações de tempo de retenção, inclusive promovendo algumas coeluições de picos. Assim sendo, a compra do eluente pronto é mais vantajosa no sentido de evitar tais variações. A desvantagem da aquisição do produto pronto é o seu custo elevado, em relação ao custo do eluente preparado, e, além disto, deve-se considerar o tempo de entrega do produto, que é importado e nem sempre está disponível em estoque no Brasil.

A Figura 83 apresenta a comparação da separação da mesma mistura de padrões com a utilização da fase móvel adquirida no *kit* AccQ.Tag® (A) e com a fase móvel preparada no laboratório (B).

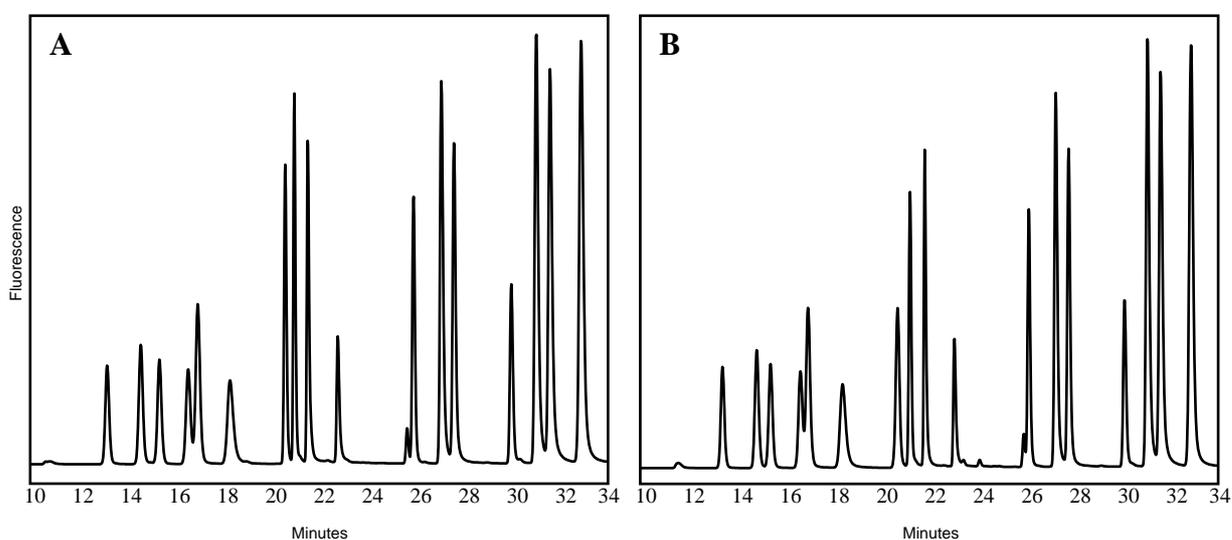


Figura 83 – Cromatogramas de padrões de aminoácidos separados com a utilização da fase móvel A pronta adquirida no *kit* comercial (A) e com a fase A formulada no laboratório (B).

Com os devidos cuidados no preparo do eluente A, especialmente no controle da umidade do acetato de sódio, no pHmetro devidamente calibrado e com sensibilidade de 0,01 unidades de pH, e na qualidade dos reagentes utilizados, o preparo do eluente A no próprio laboratório se mostrou viável e com custo vantajoso.

4.2.2 Análise de aminoácidos sulfurados

A análise cromatográfica, após a oxidação com ácido perbórico seguida de hidrólise ácida, dos padrões de cisteína e metionina, revelou que o derivado AQC do ácido cisteico elui logo no início da corrida cromatográfica, enquanto o derivado sulfona da metionina teve retenção muito maior.

Os tempos de retenção para os dois derivados são diferentes dos derivados preparados sem a oxidação com ácido perbórico (Figura 82 página 110). Isto era esperado, pois a oxidação dos grupamentos sulfurados das moléculas promove alteração em sua polaridade,

tornando-as mais polares. Sem o procedimento de oxidação, o derivado AQC da cisteína apresentava tempo de retenção de 25,6 minutos, enquanto a metionina 28,0 minutos.

A adição de uma alíquota dos derivados oxidados dos aminoácidos sulfurados com a mistura dos padrões de aminoácidos derivados, utilizados na análise dos resistentes à hidrólise ácida, revelou que a metionina oxidada apresentava coeluição. Por esta razão, modificações no gradiente do método original de Liu *et al.* (1995), utilizado para separação dos demais derivados de aminoácidos, foram necessárias para a separação do derivado da metionina. A coluna cromatográfica originalmente utilizada (AccQ.Tag[®]) também foi substituída por uma coluna maior (YMC[®]; 250 x 4,6mm; 5 μ m). O cromatograma da Figura 84 apresenta a separação dos padrões após as modificações propostas.

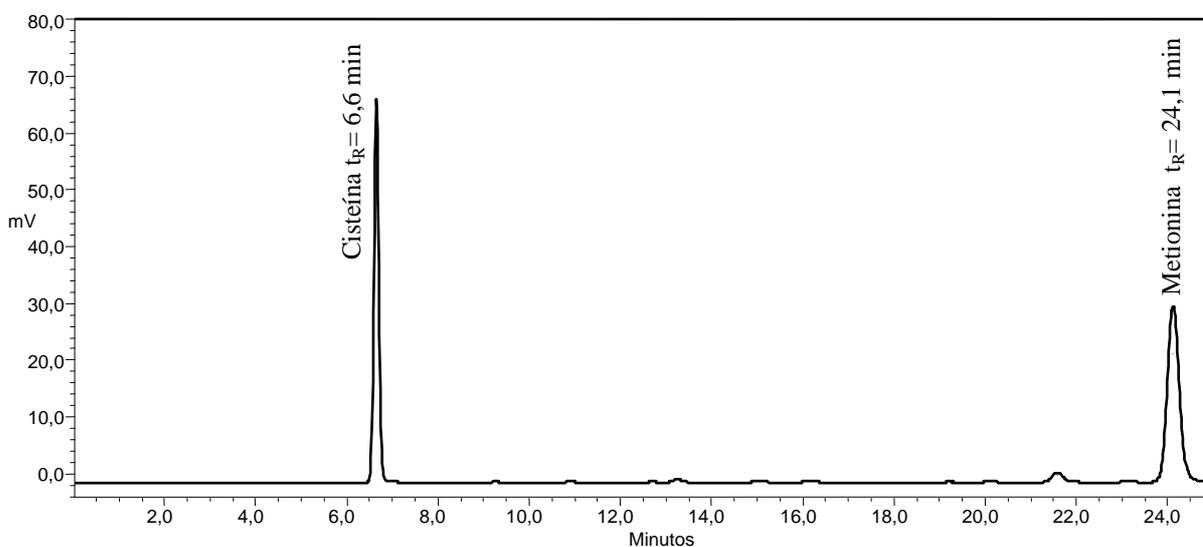


Figura 84 - Cromatograma dos derivados AQC de aminoácidos sulfurados após oxidação com ácido perbórmico seguida por hidrólise ácida.

Como o procedimento de oxidação com ácido perbórmico não remove das amostras os demais aminoácidos presentes, foi necessária a avaliação da seletividade do método modificado em separar os derivados sulfurados oxidados dos demais aminoácidos ou interferentes presentes nas amostras. Para isso, foi realizada a análise de uma amostra de feijão moído. Na Figura 85 da página 113 está apresentado o cromatograma obtido após a oxidação e hidrólise ácida da amostra de feijão.

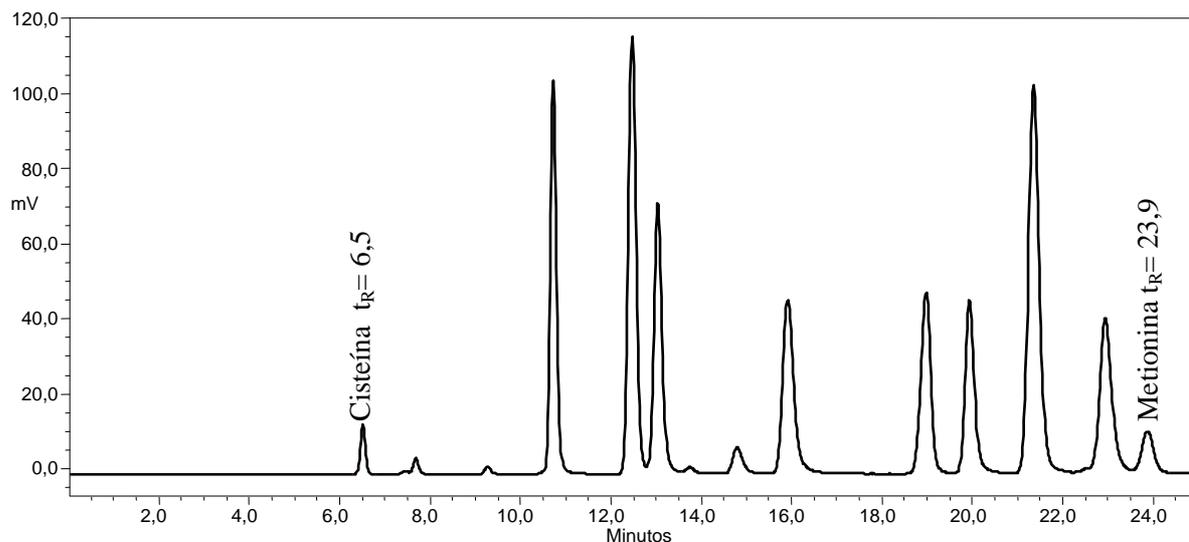


Figura 85 - Cromatograma de uma amostra de feijão após oxidação com ácido perfórmico, hidrólise ácida e derivatização com AQC.

Com o propósito de confirmação da identidade dos picos dos derivados dos dois aminoácidos sulfurados, foi adicionado ao hidrolisado de feijão uma alíquota da mistura dos padrões de sulfurados preparado anteriormente (teste de adição de padrão). No cromatograma obtido (Figura 86), é possível observar o incremento dos picos referentes aos derivados sulfurados, em relação à análise anterior e aos demais picos presentes (Figura 85).

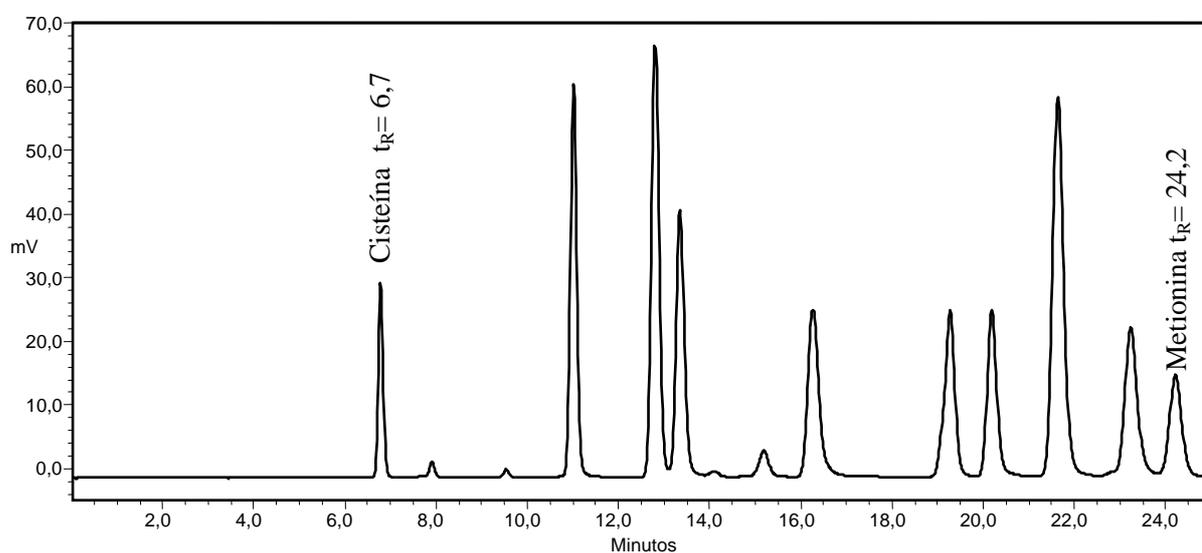


Figura 86 - Cromatograma da amostra hidrolisada de feijão após fortificação com padrões oxidados de metionina e cisteína.

Assim sendo, é possível afirmar que as modificações propostas no método cromatográfico de análise de aminoácidos permitiram a separação seletiva dos derivados AQC dos aminoácidos sulfurados oxidados.

4.2.2.1 Implantação de método de análise rápida para sulfurados

Apesar da seletividade do método proposto para a separação dos aminoácidos sulfurados, duas situações motivaram a tentativa de implantação de um método mais rápido: o tempo de análise de 35 minutos, e o fato de apenas os dois picos referentes à cisteína e à metionina serem quantificados, ou seja, os demais picos presentes nas amostras não são de interesse, e, conseqüentemente, não necessitam serem separados entre si.

A utilização da nova coluna cromatográfica proposta, com tamanho de partícula de 2,6 μ m, foi eficiente na separação dos derivados oxidados de metionina e cisteína. A análise do hidrolisado de feijão mostrou que, apesar da não separação adequada dos demais picos presentes, os dois de interesse foram perfeitamente resolvidos em apenas 12 minutos de corrida (Figura 87).

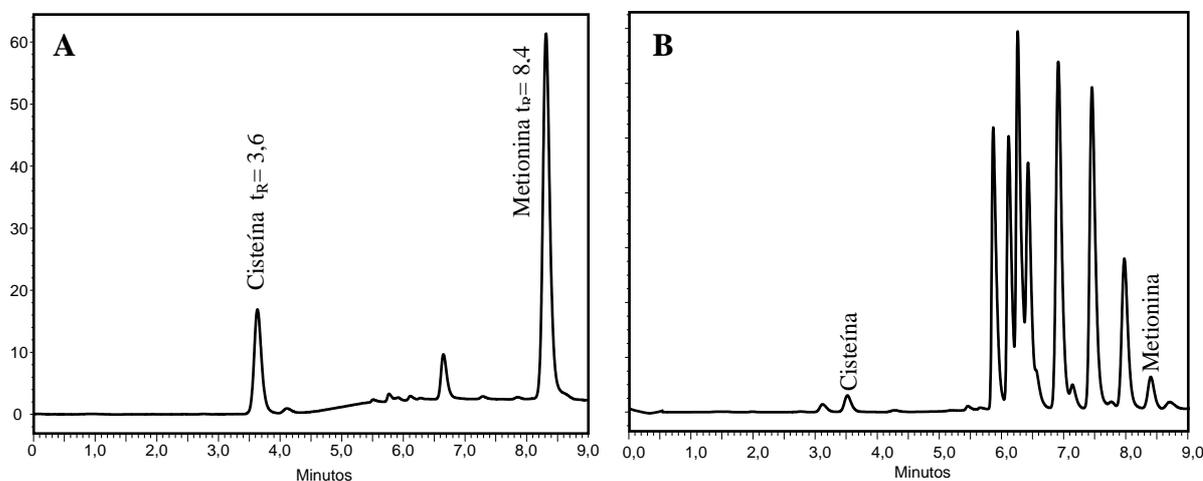


Figura 87 - Cromatogramas dos padrões de aminoácidos sulfurados (A) e de uma amostra de hidrolisado de feijão (B), ambos utilizando a coluna com partícula de 2,6 μ m.

Com o método cromatográfico rápido proposto, houve redução de 66% no tempo de análise. O gasto de solventes, e conseqüentemente a redução na geração de resíduos, foi de 55%.

4.2.3 Análise de triptofano

A não necessidade de derivatização do triptofano torna a sua separação cromatográfica mais simples, pois os demais aminoácidos presentes na amostra não são detectados por fluorescência. Os cromatogramas obtidos com a análise de solução padrão de triptofano e com a injeção do hidrolisado de farinha de soja estão apresentados na Figura 88.

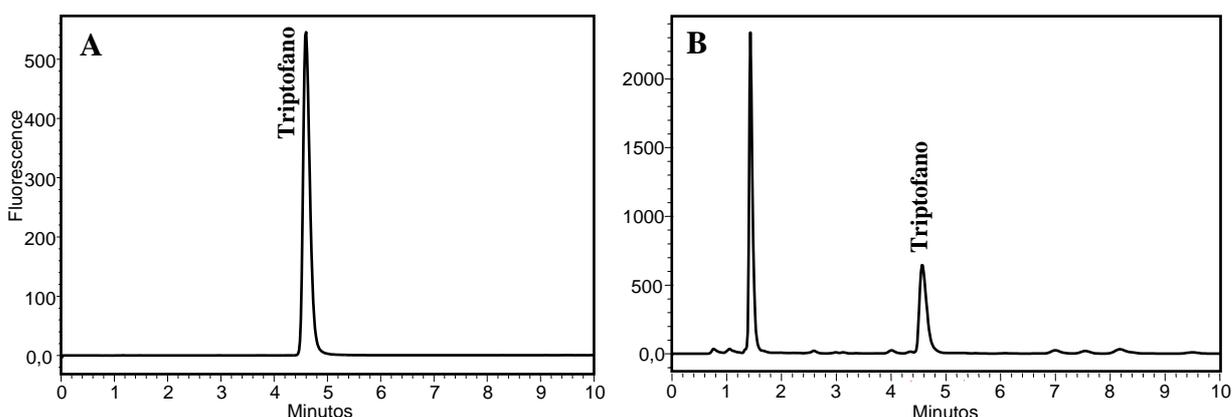


Figura 88 - Cromatograma de padrão de triptofano (A) e de amostra de farinha de soja após hidrólise alcalina (B).

Como esperado, o cromatograma obtido para a amostra de farinha de soja (Figura 88 B) apresentou a detecção de poucas substâncias, apenas um interferente em concentração alta no tempo de retenção 1,5 minutos. Isto não prejudica a quantificação do pico referente ao triptofano, que elui em 4,5 minutos. Desta maneira, o método proposto se mostrou rápido, apenas 10 minutos de corrida cromatográfica, e não sensível às alterações de matrizes.

A avaliação da resposta do método proposto foi feita com a utilização de matrizes com teores de triptofano relatados na literatura, foram utilizadas amostras de farinha de feijão e soja. Os resultados obtidos, bem como os valores encontrados na literatura estão na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados das análise de triptofano obtidos em amostra de amido, soja e feijão.

Amostra	Triptofano (mg/100g)	Literatura (mg/100g)
Amido	0,001	-
Feijão	0,178	0,256 ^a
Soja	0,641	0,62 a 0,83 ^a

Fonte: a (SLUMP e SCHREUDER, 1969).

Os valores encontrados podem ser considerados satisfatórios em relação aos dados de literatura. A amostra de amido, como esperado, apresentou teor insignificante de triptofano, o que garante a sua utilização como agente protetor durante a hidrólise alcalina sem que haja adição de triptofano à amostra.

A eficiência da hidrólise alcalina, bem como a ação protetora do amido utilizado, foram avaliadas através de ensaio de recuperação. A Tabela 12 apresenta o resultado de recuperação da solução de padrão de triptofano após a hidrólise alcalina com adição de amido. O valor médio de recuperação obtido foi de 94,4%, que está em conformidade com os dados reportados por Friedman e Finley (1971), que reportaram recuperações na faixa de 89 a 96,6%.

Tabela 12 - Resultados do ensaio de recuperação de solução padrão de triptofano.

Triptofano (pmol)	Valor Teórico (pmol)	Recuperação (%)
497,0	528,0	94,1
499,8		94,7

A análise das amostras recebidas do ensaio interlaboratorial (CIAT 2009) que a Embrapa Agroindústria de Alimentos teve a oportunidade de participar foi realizada segundo a metodologia proposta. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos na análise em triplicata de triptofano para as quatro amostras recebidas. Após envio destes resultados ao administrador do ensaio interlaboratorial, foi recebido relatório onde constava os resultados de *Z score* obtidos pelo Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, os valores estão inseridos na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados das análises de triptofano no ensaio interlaboratorial (CIAT 2009).

Amostra	Triptofano (mg/100g)	Média (mg/100g)	Z score
1-1	0,200	0,195	0,33
1-2	0,198		
1-3	0,187		
2-1	0,167	0,169	0,55
2-2	0,165		
2-3	0,176		
3-1	0,067	0,065	-0,04
3-2	0,066		
3-3	0,063		
4-1	0,074	0,072	-0,02
4-2	0,069		
4-3	0,072		

Todas as análises foram consideradas satisfatórias com *Z-score* muito inferior a 2, o que significa que o valor encontrado está muito próximo ao valor médio encontrado no estudo interlaboratorial. Este resultado indica que as adaptações e modificações realizadas no método implantado para a análise de triptofano não impactaram negativamente no resultado, ao contrário, os resultados reforçam a eficácia do método.

4.2.4 Utilização do derivatizante AQC para determinação de álcoois

A determinação de álcoois via reação de derivatização com AQC pode ser uma alternativa rápida e muito sensível para processos que necessitem desta análise, como o controle de processos fermentativos e a dosagem em bebidas alcoólicas.

A análise cromatográfica dos derivados AQC dos álcoois preparados, utilizando o mesmo método da separação dos derivados de aminoácidos resistentes (item 3.7.2 página 78), mostrou que eles apresentam forte retenção. Apenas o derivado do metanol apresentou tempo de retenção dentro do tempo de corrida, os demais derivados eluíram na etapa de limpeza da coluna e não apresentaram separação.

Modificações no gradiente de eluição do método foram então propostas na tentativa de separação dos derivados dos álcoois. A rampa de gradiente da acetonitrila foi incrementada de modo a aumentar a força da fase móvel, reduzindo assim os tempos de retenção. O tempo de corrida cromatográfica também foi reduzido como consequência da maior concentração de acetonitrila na fase móvel. O fluxo foi elevado para 1,2mL/min para acelerar ainda mais a eluição.

Na Figura 89 é apresentado o cromatograma da mistura dos derivados AQC de álcoois após os ajustes no fluxo e no gradiente de eluição original. A Tabela 14 da página 118 traz os passos do gradiente de eluição após as melhorias testadas e propostas.

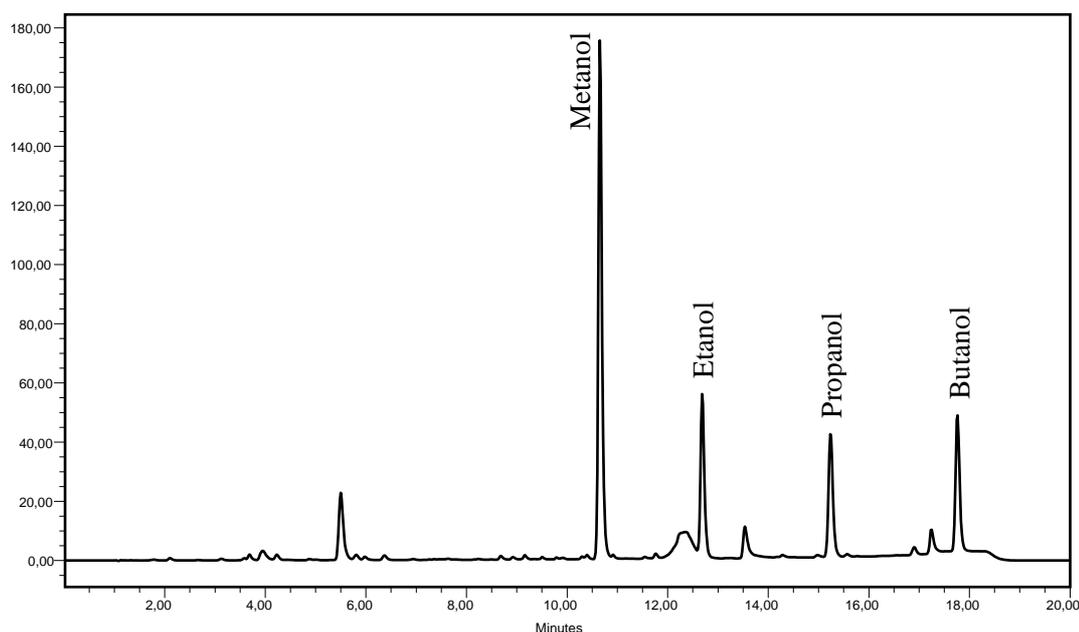


Figura 89 – Cromatograma da mistura de derivados AQC de álcoois.

As fases móveis utilizadas para a eluição foram as mesmas no método de separação dos derivados de aminoácidos resistentes à hidrólise ácida; **A**-Tampão Acetato (*Kit* AQC) e **B**-Acetonitrila (Tabela 14 página 118).

O tempo total da corrida cromatográfica para a separação foi de 20 minutos, contando a etapa de reequilíbrio da coluna para as condições iniciais.

É possível perceber a presença de inúmeros picos de interferentes ao longo da eluição da mistura dos padrões de álcoois. Isto pode ser justificado pelo baixo grau de pureza dos padrões utilizados, PA, que é incompatível com a pureza necessária para utilização de uma

substância como padrão cromatográfico. Tais interferentes provavelmente tratam-se de isômeros posicionais dos álcoois utilizados, que em tese sofreriam derivatização da mesma maneira e teriam tempos de retenção próximos aos derivados de seus isômeros.

Pode-se observar ainda que o comportamento da eluição dos derivados AQC dos álcoois é o de uma série homóloga, desta maneira, seria possível prever o tempo de retenção do derivado de acordo com o número de carbonos do álcool de origem.

Tabela 14 – Gradiente de eluição proposto para a separação de derivados AQC de álcoois.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
Inicial	95	5
5,0	90	10
10,0	75	25
15,0	65	35
16,0	60	40
17,0	95	5
20,0	95	5

Fase **A**: Tampão Acetato (*Kit AQC*) e Fase **B**: Acetonitrila.

4.2.5 Método de determinação de colágeno (hidroxiprolina) em carnes

A determinação indireta de colágeno em carnes, através da dosagem do aminoácido hidroxiprolina, foi avaliada através do método de derivatização com AQC. A separação cromatográfica sugerida foi novamente o método utilizado para a análise dos aminoácidos resistentes (item 3.7.2 página 78).

Por não estar presente na mistura padrão de aminoácidos utilizada para a construção das curvas analíticas dos aminoácidos resistentes, a hidroxiprolina foi derivatizada individualmente para verificação de seu tempo de retenção. E pela sua similaridade estrutural com a prolina, esta também foi derivatizada individualmente para verificação da possibilidade de coeluição.

Na Figura 90 da página 119 são apresentados os cromatogramas individuais dos derivados AQC dos padrões de hidroxiprolina e prolina, além do cromatograma da mistura dos dois derivados.

Como é possível ser observado, o método cromatográfico foi eficiente na separação dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Apesar da similaridade estrutural destes aminoácidos, a presença de uma hidroxila adicional na molécula da hidroxiprolina, como esperado, fez o tempo de retenção da hidroxiprolina ser inferior ao da prolina em mais de 10 minutos. O cromatograma com a mistura de ambos os derivados confirma a excelente separação entre os derivados (Figura 90 C página 119).

Com tempo de retenção de 11,1 minutos, a hidroxiprolina apresentou eluição em uma região normalmente livre de picos de derivados de aminoácidos na separação dos aminoácidos resistentes à hidrólise ácida (Figura 82 página 110). Este fato sugere que não haverá interferência dos demais aminoácidos presentes em matrizes proteicas na quantificação do colágeno através da hidroxiprolina.

No caso do interesse em quantificação de apenas a hidroxiprolina em amostras proteicas, seria ainda possível propor uma alteração no gradiente de eluição de modo a acelerar a eluição dos interferentes, que seriam os demais aminoácidos derivatizados, logo após a eluição do derivado de hidroxiprolina. Deste modo, seria possível obter uma corrida cromatográfica muito mais rápida.

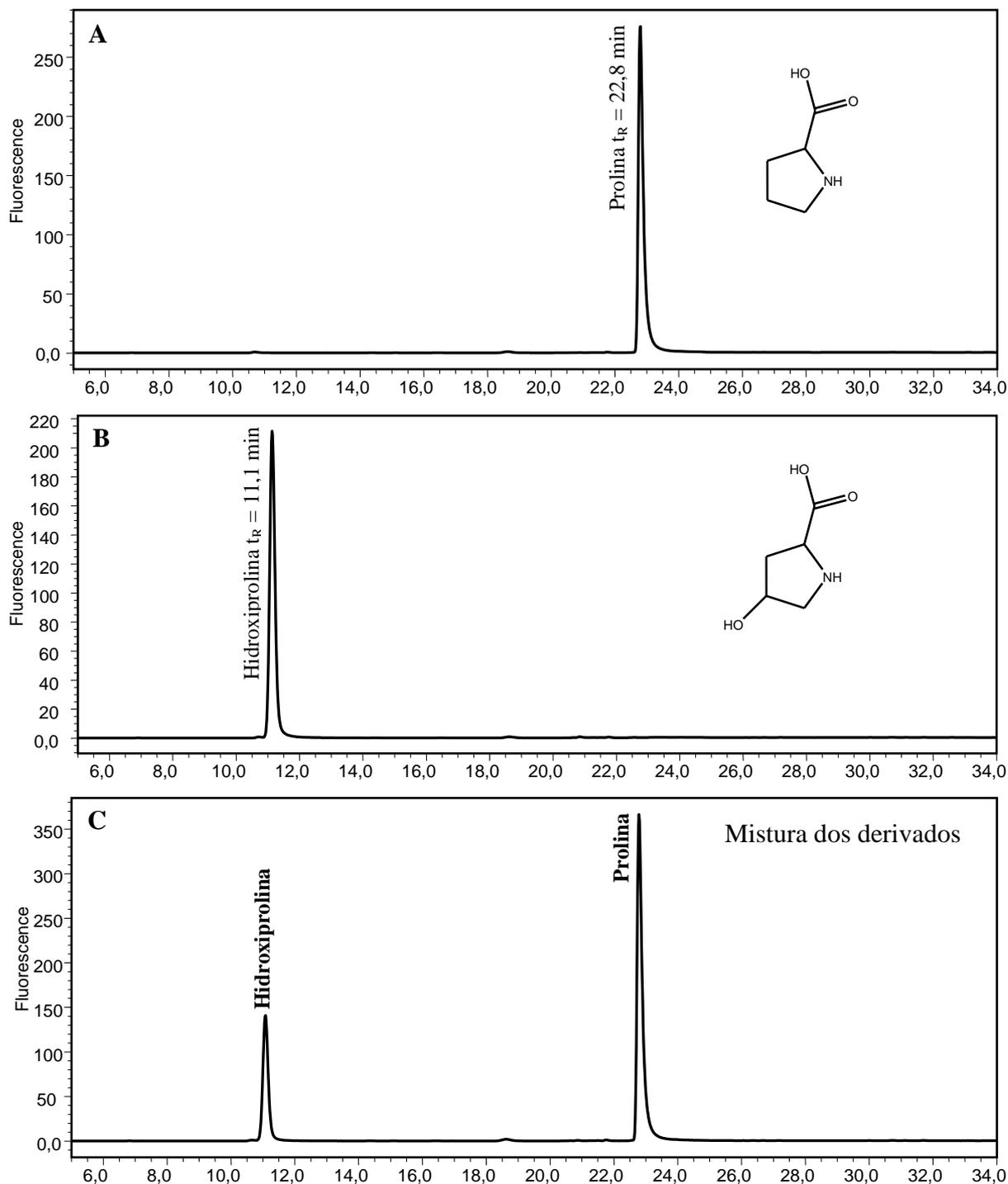


Figura 90 - Cromatogramas e estruturas dos padrões derivatizados com AQC dos aminoácidos prolina (A), hidroxiprolina (B) e da mistura de ambos (C).

A verificação da seletividade do método proposto para determinação de colágeno através da hidroxiprolina foi avaliado em amostras de carne²¹. Na Figura 91 são apresentados os cromatogramas obtidos para as três amostras de carne testadas.

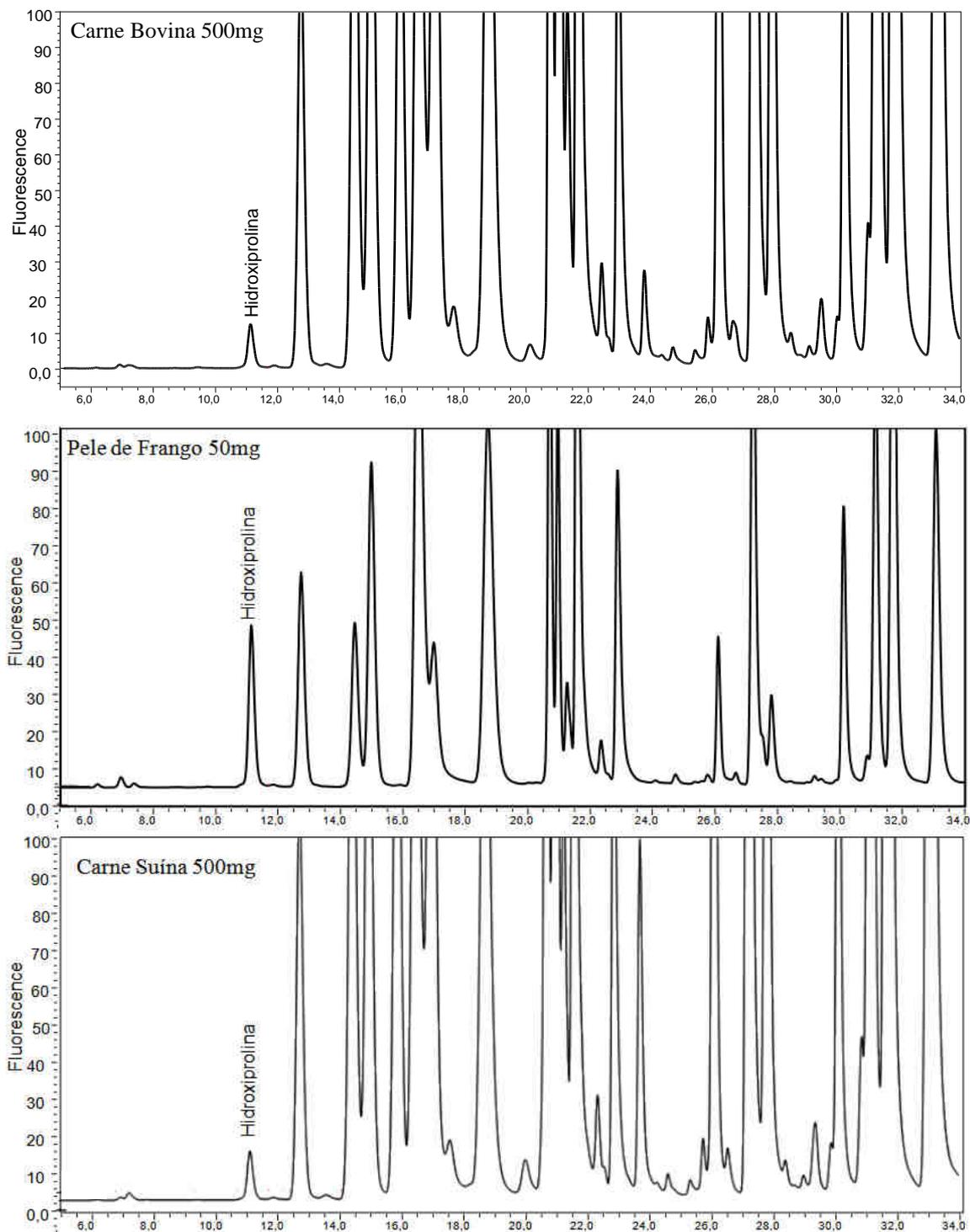


Figura 91 - Cromatogramas dos derivados hidrolisados de carnes bovina, suína e pele de frango.

²¹ O preparo das amostras para avaliação da hidroxiprolina foi uma parceria com o professor Robson Lopes Abreu (UFRRJ), os resultados foram publicados em coautoria (ABREU *et al.*, 2011).

Mesmo estando em concentração muito inferior aos demais aminoácidos presentes nas amostras cárneas, que são os picos que aparecem fora da escala nos três cromatogramas (Figura 91 página 120), a hidroxiprolina pode ser identificada facilmente.

Como esperado, a concentração de hidroxiprolina na amostra de pele de frango foi muito superior à das demais carnes (Figura 91 página 120). Mesmo com amostragem 10 vezes menor, 50mg contra 500mg das demais, a intensidade do pico de hidroxiprolina na amostra de pele de frango foi aproximadamente três vezes maior.

4.3 Método de análise de xantinas

O método para determinação das metilxantinas, cafeína, teofilina e teobromina, é análise com grande demanda no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. A separação cromatográfica foi estabelecida em coluna com tamanho de partícula de 5 μ m, é relativamente rápida e com resolução excelente. Na Figura 92 é apresentado o cromatograma de uma mistura de padrões de metilxantinas nessas condições. O tempo de análise é de 20 minutos, com efetiva separação das três metilxantinas de interesse em apenas 11 minutos.

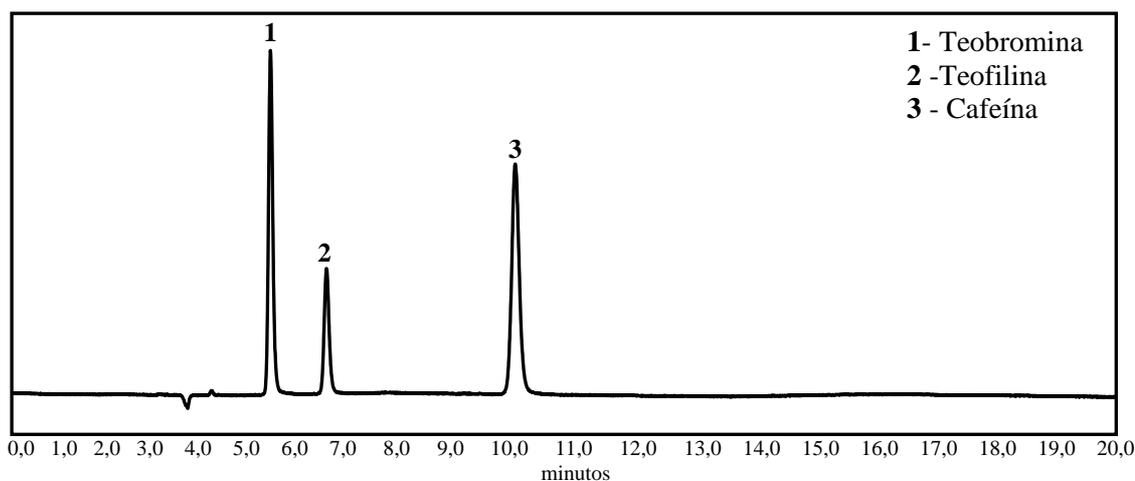


Figura 92 - Cromatograma de uma mistura de padrões de metilxantinas injetada em coluna com partícula de 5 μ m.

A eluição é em modo isocrático, de modo que não há a necessidade de tempo de reequilíbrio para o retorno às condições iniciais de análise. O tempo extra da corrida cromatográfica, 11 a 20 minutos, se faz necessário para a saída de picos de interferentes normalmente presentes nas amostras.

4.3.1 Análise rápida de cafeína, teofilina e teobromina

Mesmo considerando o método cromatográfico rápido, foi proposta uma melhoria visando reduzir ainda mais o tempo da corrida cromatográfica. A melhoria consistiu unicamente na troca da coluna cromatográfica. Foi testada uma coluna com tamanho de partícula inferior a $3\mu\text{m}$.

Na Figura 93 é apresentado o cromatograma da mesma mistura de padrões de cafeína, teofilina e teobromina utilizado na coluna de $5\mu\text{m}$. As demais condições analíticas não foram alteradas.

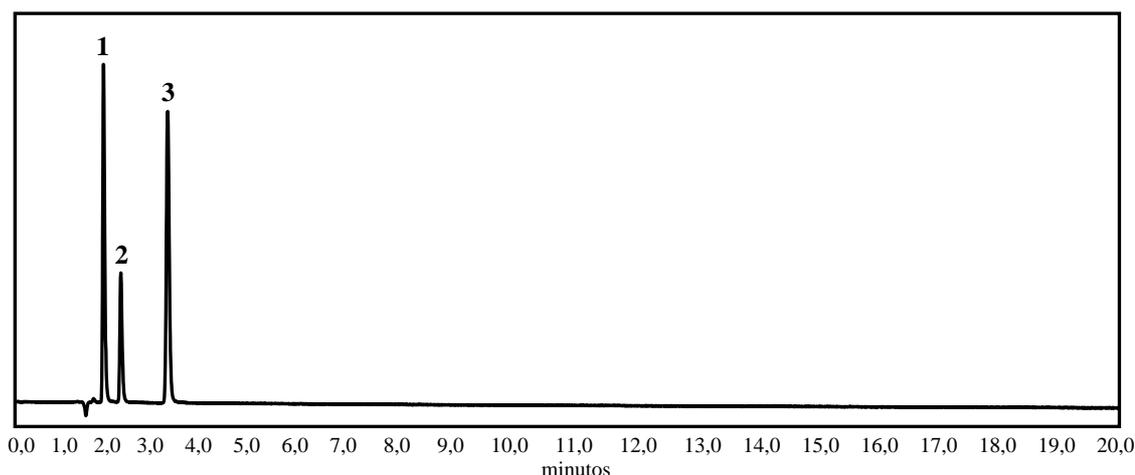


Figura 93 - Cromatograma de uma mistura de padrões de metilxantinas injetada em coluna com partícula de $2,4\mu\text{m}$.

A escala de tempo dos dois cromatogramas, Figuras 92 da página 121 e 93, foi mantida igual para efeito de melhor comparação.

Com a utilização da coluna com tamanho de partícula inferior a $3\mu\text{m}$, foi possível reduzir o tempo necessário para separação das três metilxantinas de 12 para aproximadamente 4 minutos. Isto representa uma redução de 67% no tempo de análise.

Como o fluxo da fase móvel dos dois métodos é o mesmo ($1,3\text{mL}/\text{min}$), o consumo de fase móvel foi reduzido de 15,6 para $5,2\text{mL}$ por injeção, o que também representa uma redução de 67% na geração de resíduos.

Para avaliação da seletividade do método proposto foram preparadas e injetadas três amostras de matrizes comumente analisadas. Na Figura 94 da página 123 são apresentados os cromatogramas obtidos no método rápido proposto, das injeções dos extratos das amostras avaliadas: pó de café, achocolatado e guaraná em pó.

Apesar da presença de interferentes, estes foram perfeitamente separados dos analitos de interesse, o que comprova a seletividade do método proposto para as três matrizes avaliadas.

O tempo da corrida cromatográfica total para o método proposto foi estendido para 7 minutos, justamente devido à presença dos interferentes das matrizes.

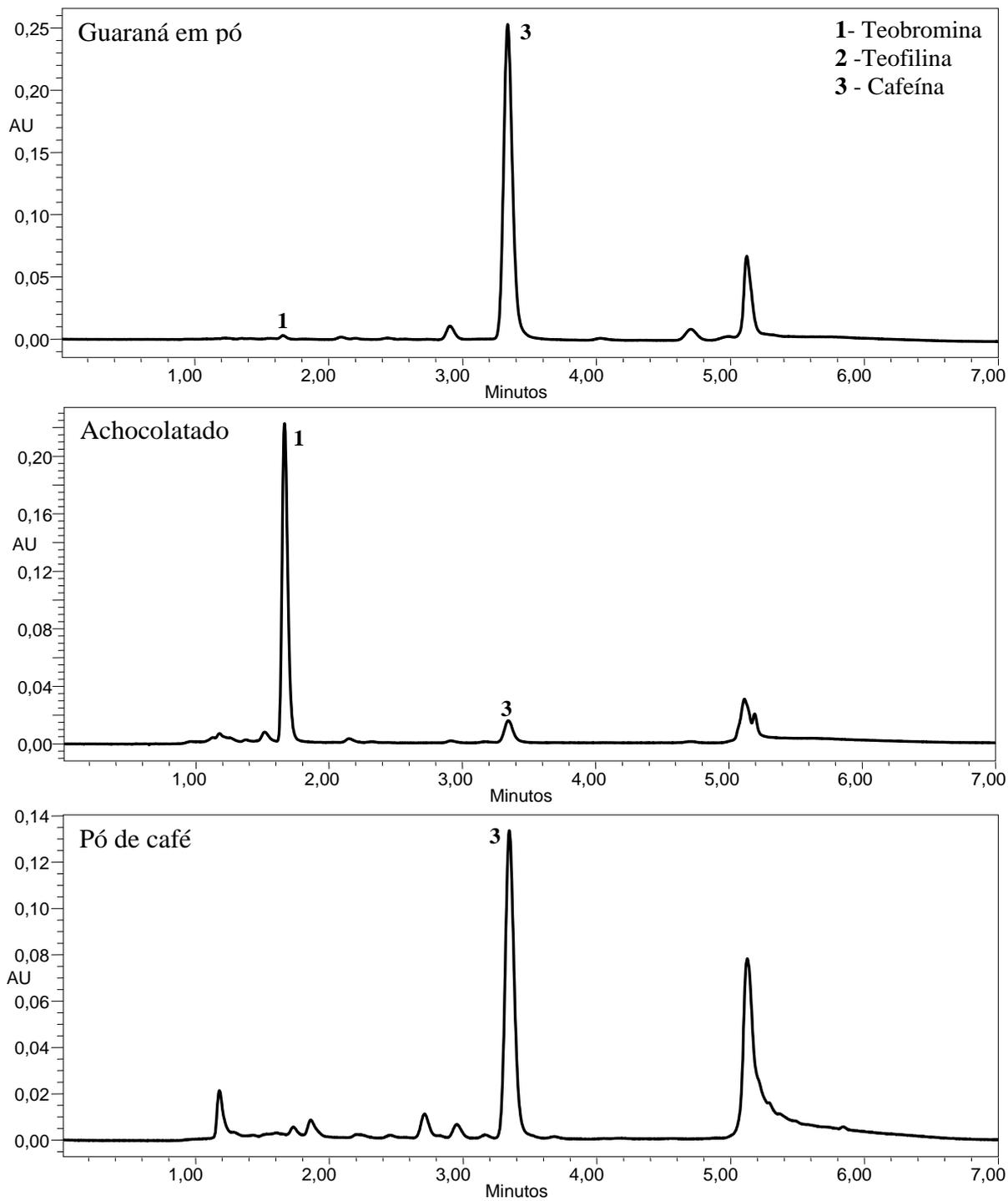


Figura 94 - Cromatogramas da análise rápida de metilxantinas em amostras de pós de café, guaraná e achocolatado.

4.3.2 Análise de produtos de degradação do ATP

Por se tratar de índice de qualidade de carne de pescado, a implantação da metodologia cromatográfica para a determinação da concentração de hipoxantina, e demais produtos de degradação do ATP, foi resposta à uma demanda de análise de pescado²².

O cromatograma da mistura dos padrões, inosina monofosfato, adenosina monofosfato, hipoxantina e inosina e o cromatograma do extrato de uma amostra de pescado está na Figura 95.

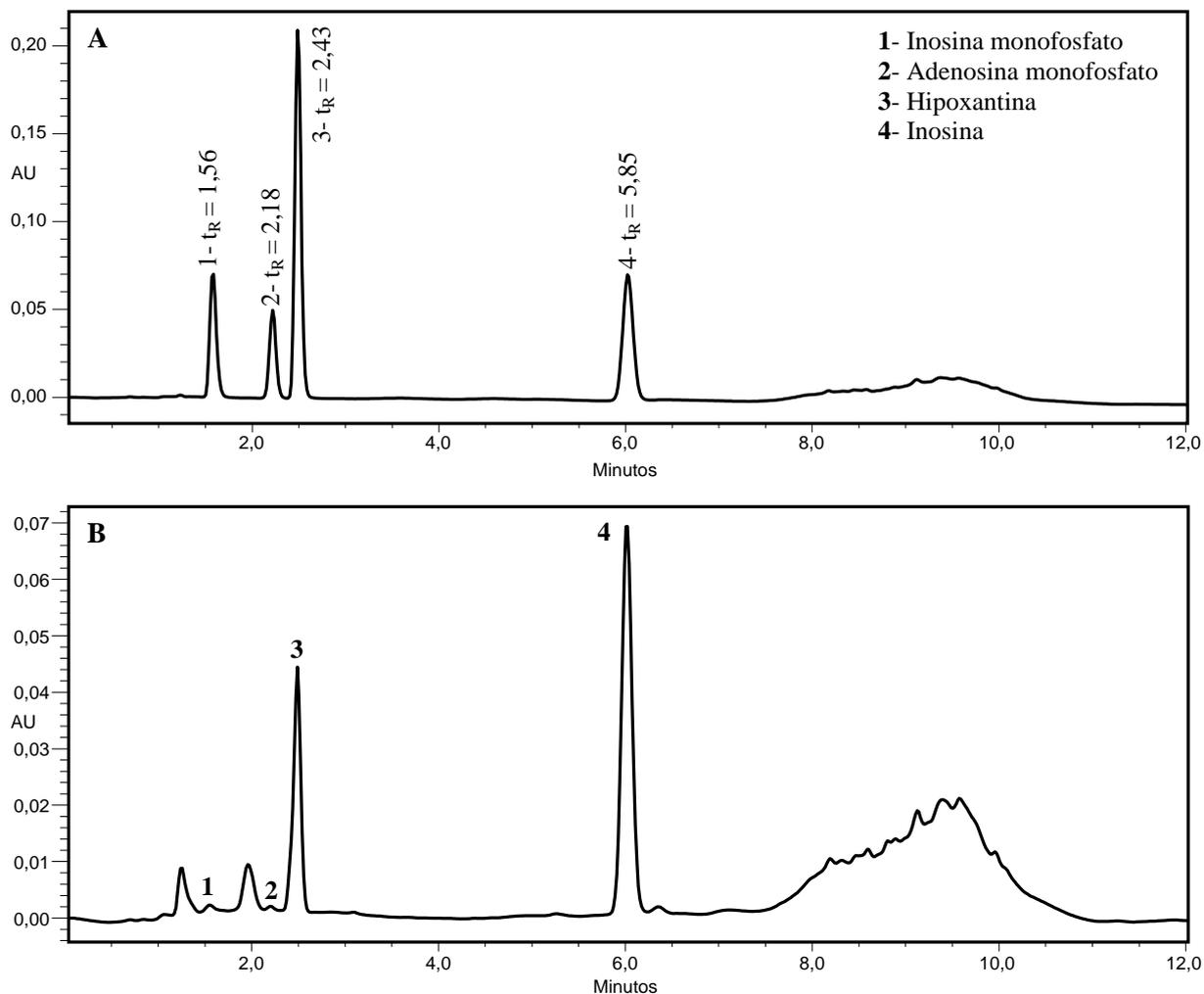


Figura 95 - Cromatograma da mistura de padrões (A) e do extrato de uma amostra de carne de pescado (B).

O método cromatográfico se mostrou seletivo para matriz de pescado. Além dos picos identificados, através dos padrões disponíveis, ainda foram separados picos que podem ser de outros intermediários da reação de degradação do ATP, para a confirmação seria necessário a disponibilidade destes padrões analíticos.

²² A implantação da análise de nucleotídeos foi em resposta à demanda da aluna Sabrina da Costa Silva Andrade, cujo assunto de tese foi a análise de pescado (ANDRADE, 2014).

5. CONCLUSÕES

Para atingir o objetivo principal deste trabalho, que foi melhorar e implantar métodos via cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de alimentos, foi necessário o isolamento das substâncias de interesse para a sua posterior utilização como padrões analíticos. Com a utilização da cromatografia líquida em escala analítica, foram isolados os carotenoides minoritários: zeinoxantina (99,0%); β -criptoxantina (98,3%); *cis*-licopeno (91,3%); 9-*cis* e 13-*cis*- β -caroteno (98,3 e 93,0%) e os majoritários α e β -caroteno (99,2 e 99,1%), todos a partir de fontes naturais. A partir de fígado bovino foi isolado retinol com 98,7%. Com a automação da coleta de efluente do cromatógrafo, através da utilização de uma válvula de 14 portas, foram isoladas, a partir de germen de soja, as seis principais isoflavonas, todas com pureza superior a 99%. As substâncias assim preparadas foram quantificadas espectrofotometricamente, as quantidades obtidas foram suficientes para a sua utilização na construção das curvas analíticas e nas melhorias dos métodos cromatográficos.

A busca por fontes ricas em carotenoides de interesse permitiu a descoberta de cinco novas fontes de carotenoides: duas de licopeno, os frutos de *Eugenia punicifolia* e de caferana (*Bunchosia armeniaca*); e três de zeaxantina, o pericarpo dos frutos de Melão-de-São-Caetano (*Mormodica charantia*), e os arilos das sementes de *Clusia major* e *Clusia fluminensis*.

A análise de ácidos fenólicos foi implantada com melhorias em relação ao método de referência, houve ganho em relação a resolução e ao tempo de análise (38% mais curto).

A análise de isoflavonas foi implantada e aplicada para a verificação de fraude em carnes pela adição de proteína vegetal (soja). A sensibilidade do método proposto foi capaz de detectar fraude pela adição de até 1,5% de proteína de soja em amostras de carnes. O método de isoflavonas foi ainda melhorado de modo a se tornar 73% mais rápido do que o método original, desta maneira, o consumo de fase móvel foi reduzido em 89% e a geração de resíduo foi reduzida na mesma proporção.

O método cromatográfico de análise de bixina e norbixina foi melhorado, ficando 55% mais rápido do que o método relatado na literatura. Houve ainda ganho de sensibilidade, em especial para a norbixina.

O método de análise de carotenoides foi adaptado para a análise de retinol, na sequencia foi utilizado para a determinação desta vitamina em leite e derivados.

O método de análise de aminoácidos resistentes à hidrólise ácida, através de derivatização pré-coluna com 6-aminoquinolilsuccimidil carbamato (AQC) foi implantado. A utilização de uma coluna cromatográfica com tamanho de partícula inferior a 3 μ m permitiu um aumento da resolução cromatográfica em relação à coluna do método original. A fase móvel utilizada, geralmente adquirida pronta, foi preparada com sucesso no próprio laboratório. Foram implantados ainda os métodos de análise de aminoácidos sulfurados e de triptofano, este último obteve aprovação em ensaio interlaboratorial.

O método com derivatização com AQC foi ainda aplicado na determinação indireta de colágeno em carnes, através da quantificação de hidroxiprolina. Modificações no método cromatográfico ainda permitiram a sua utilização para a determinação de derivados AQC de álcoois.

O método cromatográfico para análise de cafeína, teofilina e teobromina foi melhorado com a utilização de coluna cromatográfica com partícula inferior a 3 μ m, deste modo, obteve-se uma redução de 67% no tempo de análise em relação ao método original.

A separação de produtos de degradação da adenosina trifosfato (ATP) foi implantada e aplicada para a análise de amostras de pescado.

Todos os métodos implantados, melhorados e desenvolvidos neste trabalho foram utilizados para atender demandas específicas, de alunos de pós-graduação ou projetos de pesquisa internos e externos, e se tornaram análise de rotina do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. H. 100 years of chromatography - or is it 171? **Journal of Chromatography A**, v. 1061, n. 1, p. 113-114, 2004.

ABREU, R. L. **Análise de Hipoxantina e Hidroxiprolina em carne resfriada de Javali (Sus scrofa scrofa) por cromatografia líquida de alta eficiência e averiguar a correlação entre tempo, temperatura e pH com a concentração de hipoxantina**. 2008. Tese Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense

ABREU, R. L.; GODOY, R. L. O.; SANTOS, I. F.; PACHECO, S.; SOUZA, R. S. Comparação da Carne de Javali (Sus scrofa scrofa) em Relação às de Outras Espécies no que Tange a Hidroxiprolina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 1, p. 58-60, 2011.

ALBIN, D. M.; WUBBEN, J. E.; GABERT, V. M. The influence of hydrochloric acid concentration and measurement method on the determination of amino acid levels in soya bean products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 3-4, p. 173-186, 2000.

ALLRED, M. C.; MACDONALD, J. L. Determination of sulfur amino acids and tryptophan in foods and food and feed ingredients: collaborative study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 3, p. 603-606, 1988.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1702-1717, 2011.

ANDRADE, S. D. C. S. **Estabelecimento de valores de hipoxantina, índice k, índice de aminas biogênicas e MIQ para diferentes espécies de peixes comerciais mantidos sob refrigeração após captura**. 2014. (Doutorado). Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense

ANDRADE, S. D. C. S.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GODOY, R. L. D. O.; PACHECO, S.; QUEIROZ, M. D. F.; GUIMARÃES, C. F. M. Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1901-1907, 2012.

BAILEY, J. L.; MOORE, S.; STEIN, W. H. Peptides Obtained by Peptic Hydrolysis of Performic Acid-Oxidized Ribonuclease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 221, n. 1, p. 143-150, 1956.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 119-129, 1996.

BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American journal of health-system pharmacy : Official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, v. 60, n. 4, p. 356-359, 2003.

BAUMAN, W. C.; SKIDMORE, J. R.; OSMUN, R. H. Dowex 50. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1350-1355, 1948.

BAYER, E.; GROM, E.; KALTENEGGER, B.; UHMANN, R. Separation of amino acids by high performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 1106-1109, 1976.

BENSON, J. R. o-Phthalaldehyde: Fluorogenic Detection of Primary Amines in the Picomole Range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 2, p. 619-622, 1975.

BEREZKIN, V. G. Biography of Tswett, Mikhail, Semenovich, and Translation of Tswett Preliminary Communication on a New Category of Adsorption Phenomena. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 2, p. 279-281, 1989.

_____. M.S. Tswett's intellectual heritage and modern chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 587-592, 2001.

BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.

BLACK, S. D.; COON, M. J. Simple, Rapid, and Highly Efficient Separation of Amino-Acid Phenylthiohydantoin by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 281-285, 1982.

BOUCHEREAU, A.; DUHAZÉ, C.; MARTIN-TANGUY, J.; GUÉGAN, J.-P.; LARHER, F. Improved analytical methods for determination of nitrogenous stress metabolites occurring in Limonium species. **Journal of Chromatography A**, v. 836, n. 2, p. 209-221, 1999.

BUSSEMAS, H. H.; ETTRE, L. S. Forerunners of Chromatography: Runge's Self-Grown Pictures. **Milestones in Chromatography**, v. 22, n. 3, 2004.

BUSTO, O.; GUASCH, J.; BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. **Journal of Chromatography A**, v. 737, n. 2, p. 205-213, 1996.

CHEMISTRY, T. R. S. O. Contents pages. **Discussions of the Faraday Society**, v. 7, p. 1-6, 1949.

CHEN, Z. L.; PAVELIC, P.; DILLON, P.; NAIDU, R. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4830-4838, 2002.

CHIOU, S.-H.; WANG, K.-T. Peptide and protein hydrolysis by microwave irradiation. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 491, p. 424-431, 1989.

CIAT 2009. *INTERLABORATORY TRIAL 2009*, **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) da Colômbia**, 2009.

CLAESSON, S. A New Method for the Observation of Zones of Colourless Substances on a Chromatographic Column. **Nature**, v. 159, n. 4047, p. 708-708, 1947.

_____. Frontal Analysis and Displacement Development in Chromatography. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 49, n. 2, p. 183-203, 1948.

CLAESSON, S. Theory of Frontal Analysis and Displacement Development. **Discussions of the Faraday Society**, v. 7, n. 7, p. 34-38, 1949.

COHEN, S. A.; DE ANTONIS, K. M. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. **Journal of Chromatography A**, v. 661, n. 1-2, p. 25-34, 1994.

COHEN, S. A.; MICHAUD, D. P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 211, n. 2, p. 279-287, 1993.

CUNHA, C. P. D. **Preparo de Padrões de Isoflavonas de Glycine max (L.) Merrill (soja) e contribuição na Investigação Fitoquímica de Dipteryx odorata (Aubl.) Wild (cumaru) - Otimização de Análise Cromatográfica e Caracterização Estrutural de Flavonoides**. 2013. 142 (Mestrado). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.

CUNICO, R. L. **Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids with Orthophthaldehyde**. Varian. 1985

DAGUER, H.; BERSOT, L. D. S.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. D. O. Detecção de soja pelo teor de isoflavonas em lombo injetado de suíno. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 990-993, 2010.

DEANTONIS, K. M.; BROWN, P. R.; COHEN, S. A. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Synthetic Peptides Using Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. **Analytical Biochemistry**, v. 223, n. 2, p. 191-197, 1994.

DEUTSCH, M. J. Report on Vitamins and Other Nutrients. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, n. 2, p. 380-380, 1984.

DEVRIES, J. W.; KOSKI, C. M.; EGBERG, D. C.; LARSON, P. A. Comparison between a spectrophotometric and a high-pressure liquid chromatography method for determining tryptophan in food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 896-898, 1980.

DIAS, S. D. S. **Determinação de Adulteração por Adição de Leite Bovino em Queijo Bupalino**. 2012. 89 Tese Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ.

DÍAZ, J.; LLIBERIA, J. L.; COMELLAS, L.; BROTO-PUIG, F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 719, n. 1, p. 171-179, 1996.

DREZE, A. Le Dosage Du Tryptophane Dans Les Milieux Naturels .2. La Stabilité Du Tryptophane Au Cours De Lhydrolyse Alcaline Effectuee En Presence Dhydrates De Carbone. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**, v. 42, n. 4, p. 407-417, 1960.

EDMAN, P.; HÖGFELDT, E.; SILLÉN, L. G.; KINELL, P.-O. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p. 283-293, 1950.

EINARSSON, S.; JOSEFSSON, B.; LAGERKVIST, S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 282, p. 609-618, 1983.

EMENHISER, C.; SANDER, L. C.; SCHWARTZ, S. J. Capability of a polymeric C30 stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 707, n. 2, p. 205-216, 1995.

ENGELHARDT, H. One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 800, n. 1-2, p. 3-6, 2004.

ETTRE, L. S. M.S. Tswett and the 1918 Nobel Prize in chemistry. **Chromatographia**, v. 42, n. 5-6, p. 343-351, 1996.

_____. The predawn of paper chromatography. **Chromatographia**, v. 54, n. 5-6, p. 409-414, 2001.

_____. M.S. Tswett and the invention of chromatography. **Lc Gc Europe**, v. 16, n. 9, p. 2-7, 2003.

ETTRE, L. S.; HORVATH, C. Foundations of modern liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 422A-446a, 1975.

ETTRE, L. S.; MORRIS, P. J. T. Katharine Hope Coward: A pioneering user of chromatography. **Chromatographia**, v. 60, n. 11-12, p. 613-617, 2004.

ETTRE, L. S.; SAKODYNSKII, K. I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903–1910). **Chromatographia**, v. 35, n. 5-6, p. 329-338, 1993.

ETTRE, L. S.; WIXOM, R. L. Palmer, Leory, Sheldon (1887-1944) and the Beginnings of Chromatography in the United-States-of-America. **Chromatographia**, v. 37, n. 11-12, p. 659-668, 1993.

FARIA, A. M.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. State-of-the-Art in Immobilized Polymer Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1385-1398, 2009.

FELBERG, I. **Mistura em pó para bebida à base de extrato de soja e café solúvel: elaboração, caracterização química, avaliação sensorial e biodisponibilidade das isoflavonas**. 2010. 186 Tese Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FELBERG, I.; CABRAL, L. C. Otimização do processo de descascamento de soja utilizando descascador de discos paralelos horizontais. **Comunicado Técnico Agroindústria de Alimentos**, v. 43, p. 4, 2001.

FRIEDMAN, M.; FINLEY, J. W. Methods of tryptophan analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 626-631, 1971.

GARDINALI, P. R.; ZHAO, X. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 521-528, 2002.

GIBSON, H. W. Chemistry of formic acid and its simple derivatives. **Chemicals and Plastics** p. 673, 1969.

GODOY, R. L. O.; FELBERG, I.; PACHECO, S.; R., O. D. **Análises preliminares para implantação do método de avaliação de isoflavonas em produtos de soja**. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, São Paulo 2005.

GOETHE, J. W. V.; BIEDERMANN, W.; LYON, O. **Goethes Gespräche**. Leipzig: F. W. v. Biedermann, 1889. 10 v.

GOPPELSROEDER, F. **Capillaranalyse**. E. Birkhäuser, 1901.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 121-137, 1996.

GRUBER, K. A.; STEIN, S.; BRINK, L.; RADHAKRISHNAN, A.; UDENFRIEND, S. Fluorometric assay of vasopressin and oxytocin: a general approach to the assay of peptides in tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 4, p. 1314-1318, 1976.

GUO, S.; DUAN, J. A.; QIAN, D. W.; TANG, Y. P.; QIAN, Y. F.; WU, D. W.; SU, S. L.; SHANG, E. X. Rapid Determination of Amino Acids in Fruits of *Ziziphus jujuba* by Hydrophilic Interaction Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2709-2719, 2013.

HARFENIST, E. J. The Amino Acid Compositions of Insulins Isolated from Beef, Pork and Sheep Glands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 22, p. 5528-5533, 1953.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 1, p. 65-74, 1984.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C.; CASAGRANDE, J. T. Endogenous Hormones as a Major Factor in Human Cancer. **Cancer Research**, v. 42, n. 8, p. 3232-3239, 1982.

HERESZTYN, T.; WORTHLEY, M. I.; HOROWITZ, J. D. Determination of l-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 805, n. 2, p. 325-9, J 2004.

HIRS, C. H.; MOORE, S.; STEIN, W. H. Isolation of amino acids by chromatography on ion exchange columns; use of volatile buffers. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 2, p. 669-696, 1952.

_____. A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. **The Journal of biological chemistry**, v. 200, n. 2, p. 493-506, 1953.

HIRS, C. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. The amino acid composition of ribonuclease. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 941-950, 1954.

HIRS, C. H. W.; MOORE, S.; STEIN, W. H. Peptides Obtained by Tryptic Hydrolysis of Performic Acid-Oxidized Ribonuclease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 219, n. 2, p. 623-642, 1956.

HIRS, C. H. W.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Peptides obtained by chymotryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. A partial structural formula for the oxidized protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 221, n. 1, p. 151-170, 1956.

HOUGHTON, R.; GRACE, P. **UHPLC - Why all the hype ?** Waters Corporation. USA, p.4

HUGLI, T. E.; MOORE, S. Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 9, p. 2828-34, 1972.

IDE, A. H.; CARDOSO, F. D.; SANTOS, M. M. D.; KRAMER, R. D.; AZEVEDO, J. C. R. D.; MIZUKAWA, A. Utilização da Cafeína como Indicador de Contaminação por Esgotos Domésticos na Bacia do Alto Iguaçu. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 18, n. 2, p. 201-211, 2013.

JAWORSKA, M.; STANCZYK, M.; WILK, M.; KLACZKOW, G.; ANUSZEWSKA, E.; BARZAL, J.; RZEPECKI, P. New approach for amino acid profiling in human plasma by selective fluorescence derivatization. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1653-1661, Oct 2012.

JONES, B. N.; PÄÄBO, S.; STEIN, S. Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved-Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 4, n. 4, p. 565-586, 1981.

JONES, M. E. Albrecht Kossel, a biographical sketch. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 26, n. 1, p. 80-97, 1953.

JÖSSANG, P. Homage to Tswett. **Nature**, v. 356, n. 6365, p. 100-100, 1992.

KAHLBAUM, G. W. A. **The letters of Jöns Jakob Berzelius and Christian Friedrich Schönbein, 1836-1847**. Williams and Norgate, 1900. 120.

KHAYAT, A.; REDENZ, P. K.; GORMAN, L. A. Quantitative-Determination of Amino-Acids in Food by High-Pressure Liquid-Chromatography. **Food Technology**, v. 36, n. 6, p. 46-50, 1982.

KIRKLAND, J. J.; DESTEFANO, J. J. Controlled Surface Porosity Supports with Chemically-Bonded Organic Stationary Phases for Gas and Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 8, n. 6, p. 309-314, 1970.

KLUMP, S. P.; ALLRED, M. C.; MACDONALD, J. L.; BALLAM, J. M. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: Collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 84, n. 6, p. 1865-1883, 2001.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists (JAOAC)**, v. 73, n. 1, p. 54-57, 1990.

KOOP, D. R.; MORGAN, E. T.; TARR, G. E.; COON, M. J. Purification and Characterization of a Unique Isoenzyme of Cytochrome-P-450 from Liver-Microsomes of Ethanol-Treated Rabbits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 14, p. 8472-8480, 1982.

KRASNOVSKY, A. A. Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union. **Photosynthesis Research**, v. 76, n. 1-3, p. 389-403, 2003.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. The Fruits of Collaboration: Chromatography, Amino Acid Analyzers, and the Chemical Structure of Ribonuclease by William H. Stein and Stanford Moore. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 6-8, 2005.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.

KROLL, J.; RAWEL, H.; KR; X000F; CK, R. Microwave digestion of proteins. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 207, n. 3, p. 202-206, 1998.

KUHLMANN, M.; FAGG, C. **Frutos e Sementes do Cerrado - Guia de Campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2012.

LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A. J.; SHEWRY, R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 150, n. 1, p. 1-26, 2007.

LESTER, R. L.; DICKSON, R. C. High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. **Analytical biochemistry**, v. 298, n. 2, p. 283-92, 2001.

LINDROTH, P.; MOPPER, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 1667-1674, 1979.

LIU, H. J. Determination of Amino-Acids by Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and High-Performance Liquid-Chromatography with Ultraviolet Detection. **Journal of Chromatography A**, v. 670, n. 1-2, p. 59-66, 1994.

LIU, H. J.; CHANG, B. Y.; YAN, H. W.; YU, F. H.; LIU, X. X. Determination of Amino-Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Separation. **Journal of Aoac International**, v. 78, n. 3, p. 736-744, 1995.

LIVENGOOD, J. Why was M. S. Tswett's chromatographic adsorption analysis rejected? **Studies in History and Philosophy of Science**, v. 40, n. 1, p. 57-69, 2009.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas de Consumo in natura**. São Paulo: Instituto Planatarum de Estudos da Flora: 640 p. 2006.

MACDONALD, J. L.; KRUEGER, M. W.; KELLER, J. H. Oxidation and hydrolysis determination of sulfur amino acids in food and feed ingredients: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists (JAOAC)**, v. 68, n. 5, p. 826-829, 1985.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MARTIN, A. J.; SYNGE, R. L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **The Biochemical journal**, v. 35, n. 12, p. 1358-1368, 1941.

MARTÍNEZ, À.; RIU, J.; BUSTO, O.; GUASCH, J.; XAVIER RIUS, F. Validation of bias in multianalyte determination methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 2, p. 257-278, 2000.

MATTEUCCI, C. Lectures on the Physical Phenomena of Living Beings. **Longman, Brown, Green and Longmans**, 1847.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3660-3667, 2002.

MERCK&CO. **The Merck Index of Chemicals and Drugs**. 10th. Merck, 1983.

MEYER, A.; NGIRUWONSANGA, T.; HENZE, G. Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 356, n. 3-4, p. 284-287, 1996.

MEYER, V. R. Tswett, Michael Columns - Facts and Speculations. **Chromatographia**, v. 34, n. 5-8, p. 342-346, 1992.

MEYER, V. R.; ETTRE, L. S. Early evolution of chromatography: the activities of Charles Dhéré. **Journal of Chromatography A**, v. 600, n. 1, p. 3-15, 1992.

MOLNÁR-PERL, I. Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 763, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

MOORE, S. On the determination of cystine as cysteic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, n. 1, 1963.

MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1185-1190, 1958.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 367-388, 1948.

_____. Chromatography of amino acids on starch columns; solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. **The Journal of biological chemistry**, v. 178, n. 1, p. 53-77, 1949.

_____. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **The Journal of biological chemistry**, v. 192, n. 2, p. 663-681, 1951.

_____. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 907-913, 1954a.

_____. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 893-906, 1954b.

MOTTE, J. C.; WINDEY, R.; DELAFORTRIE, A. High-sensitivity fluorescence derivatization for the determination of hydroxy compounds in aqueous solution by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 728, n. 1-2, p. 333-341, 1996.

MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 777, n. 1-2, p. 129-38, 2002.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; KIRSON, I.; BIRK, Y.; BONDI, A. A new isoflavone from soya beans. **Phytochemistry**, v. 12, n. 1, p. 169-170, 1973.

NEWSELY, H. Friedrich Goppelsroeder — A protagonist of modern chromatography? **Chromatographia**, v. 30, n. 9-10, p. 595-596, 1990.

NIELSEN, H. K.; HURRELL, R. F. Tryptophan determination of food proteins by h.p.l.c. after alkaline hydrolysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, n. 9, p. 893-907, 1985.

NOBELPRIZE.ORG. The Nobel price in Chemistry 1915. 1915. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1915/willstatter-lecture.html >. Acesso em: 8 Dez 2012.

_____. The Nobel Prize in Chemistry 1952. 1952. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/index.html >. Acesso em: 2 Nov 2012.

_____. The Nobel Prize in Chemistry 1972. 1972. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/ >. Acesso em: 2 Nov 2012.

OELSHLEGEL, F. J.; SCHROEDER, J. R.; STAHMANN, M. A. A simple procedure for basic hydrolysis of proteins and rapid determination of tryptophan using a starch column. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 331-337, 1970.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. 2009. 106 Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; PEIXOTO, F. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; FELBERG, I.; BORGUINI, R. G. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. **Analytical chemistry: an Indian Journal**, v. 12, n. 5, p. 194-197, 2013.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; PORTE, A.; ROSA, J. S.; SANTIAGO, M. C. P. A. Obtenção de Padrões de cis-licopeno e beta-criptoxantina para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a Partir de Melão-de-São-Caetano e Caqui. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, 2012.

PACHECO, S.; PEIXOTO, F. M.; BORGUINI, R. G.; NASCIMENTO, L. S. M.; BOBEDA, C. R. R.; SANTIAGO, M. C. P. A.; GODOY, R. L. O. Micro scale extraction method for HPLC carotenoids analysis in vegetable matrices. **Scientia Agricola**, v. In press, 2014.

PALACE, G. P.; FITZPATRICK, R.; TRAN, K. V.; PHOEBE, C. H.; NORTON, K. Determination of amino acids in diverse polymeric matrices using HPLC, with emphasis on agars and agaroses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 3, p. 509-518, 1999.

PALACE, G. P.; PHOEBE, C. H., JR. Quantitative determination of amino acid levels in neutral and glucosamine-containing carbohydrate polymers. **Analytical biochemistry**, v. 244, n. 2, p. 393-403, 1997.

PALMER, L. S. **Carotin the principal natural yellow pigment of milk fat.** 1913. (Thesis). University of Missouri

PALMER, L. S. **Carotenoids and Related Pigments: The Chromolipids.** Chemical Catalog Company, 1922.

PARTRIDGE, M. W.; BRIMLEY, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 5. Separation of the basic amino-acids. **The Biochemical journal**, v. 46, n. 3, 1950.

PARTRIDGE, S. M. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 3. Fractionation of a protein hydrolysate. **Biochemical Journal**, v. 44, n. 5, p. 521-527, 1949a.

_____. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 4. the isolation of glucosamine and histidine from a protein hydrolysate. **The Biochemical journal**, v. 45, n. 4, p. 459-463, 1949b.

PARTRIDGE, S. M.; BRIMLEY, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 2. The separation of organic acids and acidic amino-acids by the use of anion-exchange resins. **Biochemical Journal**, v. 44, n. 5, p. 513-521, 1949.

_____. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 6. effect of temperature on the order of displacement. **The Biochemical journal**, v. 48, n. 3, p. 313-20, 1951a.

_____. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 7. Separations using a strongly basic resin. **Biochemical Journal**, v. 49, n. 2, p. 153-157, 1951b.

_____. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 8. A systematic method for the separation of amino-acids. **The Biochemical journal**, v. 51, n. 5, p. 628-639, 1952.

PARTRIDGE, S. M.; WESTALL, R. G. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 1. SEPARATION OF ORGANIC BASES AND AMINO-ACIDS USING CATION-EXCHANGE RESINS. **Biochemical Journal**, v. 44, n. 4, p. 418-428, 1949.

PAWLOWSKA, M.; CHEN, S.; ARMSTRONG, D. W. Enantiomeric separation of fluorescent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, tagged amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 641, n. 2, p. 257-265, 1993.

PERKIN, A. G.; NEWBURY, F. G. LXXIX.-The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 75, p. 830, 1899.

PERSEUS-DIGITAL-LIBRARY. Pliny the Elder, The Natural History 77-79. 2012. Disponível em: < <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/> >. Acesso em: Acesso em 13/11/2012.

PFEIFER, R.; KAROL, R.; KORPI, J.; BURGOYNE, R.; MCCOURT, D. Practical Application of Hplc to Amino-Acid-Analysis. **American Laboratory**, v. 15, n. 3, 1983.

PISANO, J. J.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; HORNING, E. C. Gas chromatography of phenylthiohydantoin and dinitrophenyl derivatives of amino acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 7, n. 1, p. 82-86, 1962.

PRIETO, J. A.; COLLAR, C.; DEBARBER, C. B. Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Biochemical-Changes in Free Amino-Acids during Wheat-Flour Mixing and Bread Baking. **Journal of Chromatographic Science**, v. 28, n. 11, p. 572-577, 1990.

RAO, A. V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**, v. 22, n. 10, p. 1125-1131, 2002.

REBANE, R.; OLDEKOP, M. L.; HERODES, K. Comparison of amino acid derivatization reagents for LC-ESI-MS analysis. Introducing a novel phosphazene-based derivatization reagent. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 904, p. 99-106, 2012.

REISCHL, R. J.; LINDNER, W. Methoxyquinoline labeling-A new strategy for the enantioseparation of all chiral proteinogenic amino acids in 1-dimensional liquid chromatography using fluorescence and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1269, p. 262-269, 2012.

REVERTER, M.; LUNDH, T.; LINDBERG, J. E. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 696, n. 1, p. 1-8, 1997.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 657-691, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington D.C.: International Life Sciences Institute OMNI Press, 2001. 64.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CORADIN, L.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J.; BIODIVERSIDADE, M. D. M. A. S. D. B. E. F. D. D. C. D. **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos.** Ministério do Meio Ambiente, Departamento de Conservação da Biodiversidade, 2008.

ROGNUM, T. O.; HAUGE, S.; OYASAETER, S.; SAUGSTAD, O. D. A new biochemical method for estimation of postmortem time. **Forensic science international**, v. 51, n. 1, p. 139-146, 1991.

ROTH, M. Fluorescence reaction for amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 880-882, 1971.

ROTH, M.; HAMPÁĽ, A. Column chromatography of amino acids with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 83, p. 353-356, 1973.

RUBIN, M. B. The history of ozone. The Schonbein period, 1839-1868. **Bulletin for the History of Chemistry**, v. 26, n. 1, 2001.

RUNGE, F. F. **Das Od als Bildungstrieb der Stoffe : Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern.** Oranienburg, 1866 ; (Selbstverlag.) : [Druck von Trowitzsch & Sohn in Berlin], 1866.

RUNGE, F. F. **Das Od als Bildungstrieb der Stoffe: Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern.** Druck von Trowitzsch & Sohn in Berlin, 1866a.

_____. **Hauswirtschaftliche Briefe: Erstes Dutzend.** 1866b.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 189-202, 2000.

SARWAR, G.; BOTTING, H. G.; PEACE, R. W. Complete amino acid analysis in hydrolysates of foods and feces by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 6, p. 1172-1175, 1988.

_____. Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 4, p. 622-626, 1989.

SATO, H.; SEINO, T.; KOBAYASHI, T.; MURAI, A.; YUGARI, Y. Determination of the Tryptophan Content of Feed and Feedstuffs by Ion-Exchange Liquid-Chromatography. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 2961-2969, 1984.

SAUGSTAD, O. D.; OLAISEN, B. Postmortem Hypoxanthine Levels in Vitreous-Humor - Introductory Report. **Forensic Science**, v. 12, n. 1, p. 33-36, 1978.

SAVOY, C. F.; HEINIS, J. L.; SEALS, R. G. Improved methodology for rapid and reproducible acid hydrolysis of food and purified proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 562-571, 1975.

SCHERTZ, F. M. The Pure Pigments, Carotin and Xanthophyll, and the Tswett Adsorption Method. **Plant physiology**, v. 4, n. 3, p. 337-348, 1929.

SCHMIDT, G. J.; OLSON, D. C.; SLAVIN, W. Amino Acid Profiling of Protein Hydrolysates Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 2, n. 7, p. 1031-1045, 1979.

SCHRAM, E.; DUSTIN, J. P.; MOORE, S.; BIGWOOD, E. J. Application de la chromatographie sur échangeur d'ions a l'étude de la composition des aliments en acides amines. **Analytica Chimica Acta**, v. 9, p. 149-162, 1953.

SCHRAM, E.; MOORE, S.; BIGWOOD, E. J. Chromatographic Determination of Cystine as Cysteic Acid. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 1, p. 33-37, 1954.

SEILER, N. Use of the Dansyl Reaction in Biochemical Analysis. In: JOHN WILEY & SONS, I. (Ed.). **Methods of Biochemical Analysis**, v.18, 1970. p.259-337. ISBN 19344325.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. São Paulo: Livraria Varela 1996.

SIMPSON, R. J.; NEUBERGER, M. R.; LIU, T. Y. Complete Amino-Acid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 7, p. 1936-1940, 1976.

SLUMP, P.; SCHREUDER, H. A. W. Determination of tryptophan in foods. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 182-186, 1969.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. 5th. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. 1197.

SOUPART, P.; MOORE, S.; BIGWOOD, E. J. Amino acid composition of human milk. **The Journal of biological chemistry**, v. 206, n. 2, p. 699-704, 1954.

SOURKES, T. L. The discovery and early history of carotene. **Bulletin for the history of chemistry**, v. 34, 2009.

SOUZA, M. D. C.; MORIM, M. P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 652-683, 2008.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1190-1206, 1958.

SPIES, J. R.; CHAMBERS, D. C. Chemical Determination of Tryptophan in Proteins. **Analytical Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 1249-1266, 1949.

STEIN, W. H. A chromatographic investigation of the amino acid constituents of normal urine. **The Journal of biological chemistry**, v. 201, n. 1, p. 45-58, 1953.

STEIN, W. H.; MOORE, S. Chromatography of amino acids on starch columns; separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine, and valine. **The Journal of biological chemistry**, v. 176, n. 1, p. 337-65, 1948.

_____. Amino acid composition of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin. **The Journal of biological chemistry**, v. 178, n. 1, p. 79-91, 1949.

_____. The free amino acids of human blood plasma. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 915-926, 1954.

STOCCHI, V.; CUCCHIARINI, L.; MAGNANI, M.; CHIARANTINI, L.; PALMA, P.; CRESCENTINI, G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. **Analytical Biochemistry**, v. 146, n. 1, p. 118-124, 1985.

STRYDOM, D. J.; COHEN, S. A. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate precolumn derivatization. **Analytical biochemistry**, v. 222, n. 1, p. 19-28, 1994.

SUN, Y. C.; XU, X. Z.; MOU, Z. B.; WANG, J.; TAN, Z. J.; WU, S. Analysis of free amino acids in Amur sturgeon by ultra-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-carbamyl. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 24, p. 3421-3426, 2012.

SYNGE, R. L. M. Chromatographic Analysis - Summarizing Paper. **Discussions of the Faraday Society**, v. 7, n. 7, p. 164-168, 1949.

TALLAN, H. H.; BELLA, S. T.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Tyrosine-O-Sulfate as a Constituent of Normal Human Urine. **The Journal of biological chemistry**, v. 217, n. 2, p. 703-708, 1955.

TALLAN, H. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. 3-Methylhistidine, a new amino acid from human urine. **The Journal of biological chemistry**, v. 206, n. 2, p. 825-834, 1954.

TANGLIU, D. D.; WILLIAMS, R. L.; RIEGELMAN, S. Disposition of Caffeine and Its Metabolites in Man. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 224, n. 1, p. 180-185, 1983.

TARR, G. E. Rapid separation of amino acid phenylthiohydantoin by isocratic high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 111, n. 1, p. 27-32, 1981.

TAYLOR, R. F. Chromatography of Carotenoids and Retinoids. **Advances in Chromatography**, v. 22, p. 157-213, 1983.

TECHNOLOGY, T. F. A. O. **Victor Hartwall Sr. (1800–1857) The scientist who started up an industry** 2004.

TIBURSKI, J. H. **Polpa de Cajá (Spondias mombin L.) Processada por Alta Pressão Hidrostática**. 2009. (Mestrado). Instituto de Tecnologia, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. D. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2326-2331, 2011.

TISELIUS, A. A New Procedure for Adsorption Analysis. **Science**, v. 94, n. 2432, p. 145-146, 1941.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.

TOENNIES, G. The oxidative conversion of casein into protein free of methionine and tryptophane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 145, n. 2, p. 667-670, 1942.

TORAN, A. A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M. J.; LÓPEZ, J. C. HPLC Method for Cyst(e)ine and Methionine in Infant Formulas. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1132-1136, 1996.

TSWETT, M. S. About a New Category of Adsorption Phenomena and Their Application for Biochemical Analysis. **Tr. Warsaw. Obshch. Estestvoisp. Otd. Biol.**, v. 14, p. 20-39, 1903.

UDENFRIEND, S.; STEIN, S.; BOHLEN, P.; DAIRMAN, W.; LEIMGRUBER, W.; WEIGELE, M. Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. **Science**, v. 178, n. 4063, p. 871-872, 1972.

UDOSEN, E. O.; IFON, E. T. Fatty acid and amino acid composition of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla*). **Food Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 155-160, 1990.

VAN WANDELEN, C.; COHEN, S. A. Using quaternary high-performance liquid chromatography eluent systems for separating 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized amino acid mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 763, n. 1-2, p. 11-22, 1997.

VANDERMEER, J. M. Amino-Acid-Analysis of Feeds in the Netherlands - 4-Year Proficiency Study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, n. 3, p. 394-398, 1990.

VAUQUELIN, L. N.; ROBIQUET, P. J. The discovery of a new plant principle in *Asparagus sativus*. **Annales de Chimie**, v. 572, n. 1, 1806.

VELÁZQUEZ, C.; LLOVERA, M.; PLANA, J.; CANELA, R. Effect of solvents on the fumonisins analysis by high-performance liquid chromatography with AccQ.Fluor as the derivatizing reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 469-472, 2000.

VOSKRESENSKY, A. **Annalen der Chemie und Pharmacie: vereinigte Zeitschrift des Neuen Journals der Pharmacie für Ärzte, Apotheker und Chemiker u. des Magazins für Pharmacie und Experimentalkritik**. Winter, 1842.

WALTER, E. D. Genistin (an Isoflavone Glucoside) and its Aglucone, Genistein, from Soybeans. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, n. 12, p. 3273-3276, 1941.

WANG, G. J.; KUAN, S. S.; FRANCIS, O. J.; WARE, G. M.; CARMAN, A. S. A Simplified Hplc Method for the Determination of Phytoestrogens in Soybean and Its Processed Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 185-190, 1990.

WANG, H.; LI, J.; LIU, X.; YANG, T. X.; ZHANG, H. S. N-hydroxysuccinimidyl fluorescein-O-acetate as a fluorescent derivatizing reagent for catecholamines in liquid chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 281, n. 1, p. 15-20, 2000.

WANG, H.; LI, J.; YANG, T. X.; ZHANG, H. S. N-Hydroxysuccinimidyl-Fluorescein-O-Acetate for Precolumn Fluorescence Derivatization of Amino Acids and Oligopeptides in Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, n. 9, p. 365-369, 2001.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1666-1673, 1994.

WEBER, G. Polarization of the Fluorescence of Macromolecules .2. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin. **Biochemical Journal**, v. 51, n. 2, p. 155-168, 1952.

WEIGELE, M.; BLOUNT, J. F.; TENGI, J. P.; CZAJKOWSKI, R. C.; LEIMGRUBER, W. Fluorogenic ninhydrin reaction. Structure of the fluorescent principle. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 11, p. 4052-4054, 1972.

WEISS, T.; BERNHARDT, G.; BUSCHAUER, A.; JAUCH, K. W.; ZIRNGIBL, H. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of polyamines and their monoacetyl conjugates by fluorescence detection after derivatization with N-hydroxysuccinimidyl 6-quinolinyl carbamate. **Analytical biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 294-304, 1997.

WEST, L. G.; BIRAC, P. M.; PRATT, D. E. Separation of the isomeric isoflavones from soybeans by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 150, n. 1, p. 266-268, 1978.

WESTALL, F.; HESSER, H. Fifteen-minute acid hydrolysis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 610-613, 1974.

WILLSTÄTTER, R. **Untersuchungen Uebwr Chlorophyll**. Springer, 1913.

WONG, W. S. D.; OSUGA, D. T.; BURCHAM, T. S.; FEENEY, R. E. Determination of tryptophan as the reduced derivative by acid hydrolysis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 143, n. 1, p. 62-70, 1984.

WU, N.; COLLINS, D. C.; LIPPERT, J. A.; XIANG, Y.; LEE, M. L. Ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for fast separations. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 12, n. 8, p. 462-469, 2000.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs? **Ageing research reviews**, v. 6, n. 2, p. 150-188, 2007.

YOKOYAMA, H.; BOETTGER, H. Triphasiaxanthin, a New Carotenone. **Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 2080-2082, 1970.

ZHANG, X. L.; ZHAO, T.; CHENG, T.; LIU, X. Y.; ZHANG, H. X. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 906, p. 91-95, 2012.