

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
DANIEL FILISBERTO SCHULZ

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE
ALIMENTOS

RIO DE JANEIRO
2014

DANIEL FILISBERTO SCHULZ

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Angelo da Cunha Pinto, D.Sc. e Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, D.Sc.

RIO DE JANEIRO
2014

S388

Schulz, Daniel Filisberto

Avaliação da utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução como ferramenta para análise de alimentos / Daniel Filisberto Schulz. – Rio de Janeiro: IQ/ UFRJ, 2014.
179 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Angelo da Cunha Pinto e Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

1. CLUE-TOF 2. Espectrometria de massas de alta resolução 3. Análise de alimentos. I. Pinto, Angelo da Cunha e Godoy. (Orient.). II. Ronoel Luiz de Oliveira (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

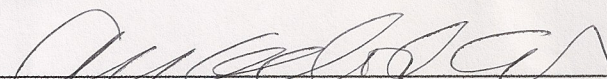
CDD: 661,004

DANIEL FILISBERTO SCHULZ

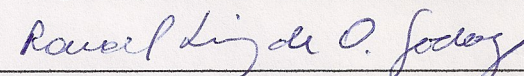
AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química do Instituto de
Química, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências (Química).


Aprovada em 29/04/2014



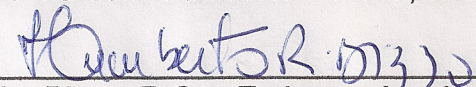
Angelo da Cunha Pinto, D.Sc., IQ-UFRJ



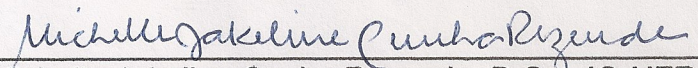
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos



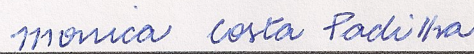
Henrique Marcelo Gualberto Pereira, D.Sc., IQ-UFRJ



Humberto Ribeiro Bizzo, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos



Michelle Jakeline Cunha Rezende, D.Sc., IQ-UFRJ



Mônica Costa Padilha, D.Sc., IQ-UFRJ

DEDICATÓRIA

À minha família, grande motivação da minha dedicação ao trabalho e ao estudo. Especialmente aos meus filhos, para quem quero deixar grande exemplo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Angelo e Ronoel, pelo apoio na realização dos trabalhos.

Aos colegas de laboratório, Jeane, Sidney, Ana Cristina, Manuela, Renata, Luzimar e Juliana, pelo companheirismo e ajuda durante as dificuldades enfrentadas com os equipamentos.

Ao Exmo. Sr. VA (Md) Paulo César e ao CF (Md) Leal, por perceberem a importância deste título para mim e para a instituição em que hoje trabalho, me incentivando a dar continuidade e finalizar este trabalho.

RESUMO

SCHULZ, Daniel Filisberto. **Avaliação da Utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução como Ferramenta para Análise de Alimentos**. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

Esta tese descreve um estudo da aplicabilidade da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo (TOF) (CLUE-TOF) na análise de alimentos em suas diversas áreas: resíduos e contaminantes, análise de compostos bioativos, e avaliação da qualidade de padrões cromatográficos isolados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso foram desenvolvidos nove métodos analíticos para CLUE-TOF: análise de aflatoxinas em amendoim; análise de cloranfenicol em mel; análise de melamina em leite; análise de tetraciclina em leite; análise de histamina em vinho; análise de ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva; análise de padrões cromatográficos de betacaroteno e zeaxantina isolados por CLAE; análise de padrão cromatográfico de retinol isolado por CLAE e análise de padrões cromatográficos de antocianinas isolados por CLAE. Todos os métodos analíticos para resíduos e contaminantes desenvolvidos apresentaram alto desempenho de seletividade, atendendo aos critérios mínimos do desempenho da seletividade para métodos confirmatórios determinados pela Comissão das Comunidades Europeias em seu documento que trata do desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados, dispensando outras análises para confirmação da identidade dos analitos. Em todos os métodos o tempo total de análise foi menor que cinco minutos, sendo os métodos de aflatoxinas e melamina os mais rápidos, levando apenas dois minutos. O fluxo de solvente também foi baixo, entre 0,2 e 0,4 mL/min. Os métodos para histamina e tetraciclina foram avaliados quanto a sua resposta quantitativa através da construção de uma curva analítica com faixa de trabalho de 0,55 a 10 µg/mL para histamina e 12,5 a 100 ng/mL para tetraciclina atendendo o mínimo exigido pelas legislações internacional, no caso da histamina e brasileira e internacional no caso da tetraciclina. O método desenvolvido para prospecção de ácidos orgânicos e fenólicos em vinho e suco de uva foi capaz de identificar seis ácidos orgânicos, oito derivados do ácido benzóico, treze derivados do ácido cinâmico, e quatorze flavonóides, sendo as antocianinas identificadas na forma

hidratada e bissulfitada. As substâncias identificadas foram comparadas entre si através da contagem de íons por “scan” (cps) e observou-se que os derivados do ácido cinâmico foram encontrados em maior quantidade e os flavonóides em menor quantidade. Esses resultados foram obtidos em uma única corrida cromatográfica em gradiente, com tempo total de sete minutos e um fluxo de apenas 0,2 mL/min. Na avaliação da qualidade dos padrões cromatográficos, os dados em alta resolução fornecidos pelo TOF foram fundamentais para fornecer credibilidade ao conjunto de informações que os caracterizaram estruturalmente: tempo de retenção, espectro de ultra violeta/visível, massa exata e dados de fragmentação. Devido ao grande poder de separação da CLUE e a alta velocidade linear do solvente nesta técnica é possível obter uma alta capacidade de análise (“high-throughput”) e uma grande economia de solvente, levando a economia de recursos e contribuindo para a chamada “química verde”. Tudo isso associado à confiabilidade dos resultados devido ao uso do TOF faz da CLUE-TOF, ou mesmo outras técnicas de CLUE com espectrometria de massas de alta resolução, uma técnica promissora a ser utilizada em laboratórios de pesquisa ou de análise de rotina.

Palavras-chave: CLUE-EM. CLUE-TOF. Espectrometria de massas de alta resolução. Análise de Alimentos.

ABSTRACT

SCHULZ, Daniel Filisberto. **Avaliação da Utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução como Ferramenta para Análise de Alimentos.** Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

This thesis is a study of the applicability of ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to time of flight (TOF) high resolution mass spectrometry (UHPLC-TOF) in food analysis in its various areas: contaminants and residues, analysis of bioactive compounds, and assessing the quality of chromatographic standards isolated by high performance liquid chromatography (HPLC). Nine analytical methods were developed utilizing UHPLC-TO: analysis of aflatoxins in peanuts; analysis of chloramphenicol in honey; analysis of melamine milk; analysis of tetracycline in milk; analysis of histamine in wine; analysis of organic and phenolic acids in wine and grape juice; analysis of chromatographic standards of beta-carotene and zeaxanthin isolated by HPLC, analysis of chromatographic standard of retinol isolated by HPLC and analysis of chromatographic standards of anthocyanins isolated by HPLC. All analytical methods for contaminants and residues developed showed high selectivity performance, meeting the minimum criteria of selectivity performance for confirmatory methods determined by the European Commission in its document that deals with the performance of analytical methods and interpretation of results, eliminating the need for other tests to confirm the identity of the analytes. All the developed methods presented total analysis time taking less than five minutes, the methods for aflatoxin and melamine were the fastest, taking only two minutes. The solvent flow was also very low, between 0.2 and 0.4 mL/min. The methods for histamine and tetracycline were evaluated for quantitative response by constructing a analytical curve with working range from 0.55 to 10 mg/mL for histamine and 12.5 to 100 ng/mL for tetracycline, covering the maximum limit of detection required for international legislation, in the case of histamine, and Brazilian and international in the case of tetracycline. The method developed for exploration of organic acids and phenolic compounds in wine and grape juice, were able to identify six organic acids, eight benzoic acid derivatives, thirteen cinnamic acid derivatives and fourteen flavonoids. The anthocyanins were detected both in hydrated and bisulfide forms. Substances identified were

quantitatively compared by the counts per scan (cps) obtained from each m/z . It was observed that the cinnamic acid derivatives were found in larger quantities and flavonoids fewer. These results were obtained in a single chromatographic gradient run with seven minutes of total time and 0.2 mL/min of solvent flow. In evaluating the quality of the chromatographic standards the high resolution data provided by TOF were for providing credibility to the set of information that characterized them structurally: retention time, ultra violet/visible spectrum, exact mass and fragmentation data. Due to the great separation power of UHPLC and the linear speed of the solvent in this technique it is possible to have a high-throughput spending a minimum of solvent and time, leading to resources saving and contributing to the "green chemistry". These factors plus reliable results, due to the use of TOF, makes UHPLC-TOF, or even other UHPLC techniques coupled with high-resolution mass spectrometers, a promising technique to be used in research or routine analytical laboratories.

Keywords: LC-MS. LC-TOF. High resolution mass spectrometry. Food Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do sistema de cromatografia criado por Tswett.	26
Figura 2	Equipamento de CLAE (I) e cromatografia em coluna aberta (II).	29
Figura 3	Bomba "Positive Displacement" (bomba seringa).	31
Figura 4	Esquema de uma bomba de pistão simples do tipo "reciprocating".	33
Figura 5	Injetor Rheodyne manual.	36
Figura 6	Estrutura das partículas do tipo core-shell.	45
Figura 7	Espectrômetro de massas do tipo setor magnético.	47
Figura 8	Esquema básico de uma fonte ESI.	49
Figura 9	Esquema de um analisador do tipo quadrupolo.	51
Figura 10	Esquema de funcionamento de um analisador do tipo TOF.	51
Figura 11	Esquema de um analisador QTrap.	52
Figura 12	Esquema de um Orbitrap.	53
Figura 13	Esquema de funcionamento de um detector CDEM.	55
Figura 14	Esquema de um MCP.	55
Figura 15	Esquema de um analisador FTICR com seu detector em forma de eletrodos.	56
Figura 16	Sistema CLUE-TOF utilizado: UPLC Acquity-Synapt, Waters.	72
Figura 17	Sistema CLUE com detecção por UV Shimadzu Nexera utilizado para análise de tetraciclinas em leite.	73
Figura 18	Espectro de massas mostrando contaminantes presentes na acetoneitrila. I marca A grau LC-MS, corrente iônica total 122; II marca A grau HPLC corrente iônica total 55; e III marca B grau HPLC, corrente iônica total 2530.	85
Figura 19	Espectro de massas mostrando contaminantes presentes em metanol. I marca B grau HPLC, corrente iônica total 91 e II marca A grau LC-MS, corrente iônica total 413.	86
Figura 20	Espectro de massas mostrando contaminação por PEG na acetoneitrila da marca B, grau HPLC que seria utilizada análise de histamina por HILIC. Corrente iônica total 2610.	86
Figura 21	Espectro de massas mostrando contaminantes presentes em quantidade tolerável na fase móvel. Condições iniciais da análise de histamina por HILIC utilizando-se acetoneitrila grau HPLC da marca B.	87
Figura 22	Estrutura das aflatoxinas detectadas pelo método desenvolvido.	94
Figura 23	CIE das aflatoxinas analisadas pelo método desenvolvido. I Aflatoxina G2, II aflatoxina G1, III aflatoxina B2 e IV aflatoxina B1. V TIC da análise.	95
Figura 24	Espectros de massas extraídos dos CIE dos picos das aflatoxinas. I Aflatoxina G1, II aflatoxina G2, III aflatoxina B1 e IV aflatoxina B2.	96
Figura 25	Estrutura do cloranfenicol.	98

Figura 26	Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI positivo obtido pelo método desenvolvido.	99
Figura 27	Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI positivo. Região do “cluster” da molécula protonada.	100
Figura 28	CIE do cloranfenicol protonado $[M + H]^+$ mostrando a área do pico de m/z 323 com concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na amostra.	100
Figura 29	Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI negativo obtido pelo método desenvolvido.	101
Figura 30	Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI negativo região do “cluster” da molécula desprotonada.	101
Figura 31	CIE do cloranfenicol desprotonado $[M - H]^-$ mostrando a área do pico de m/z 321 com concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na amostra.	102
Figura 32	Proposta de formação dos íons fragmentos do cloranfenicol no modo ESI positivo.	102
Figura 33	Proposta de formação dos íons fragmentos do cloranfenicol no modo ESI negativo.	103
Figura 34	Estrutura da melamina protonada, forma detectável no CLUE-TOF.	106
Figura 35	Espectro de massas da melamina pelo método desenvolvido.	107
Figura 36	CIE do íon m/z 127, molécula da melamina protonada $[M + H]^+$.	107
Figura 37	Proposta de fragmentação para a perda de 42 Da pela melamina protonada.	108
Figura 38	Espectro de UV/ VIS da tetraciclina.	110
Figura 39	Cromatograma da tetraciclina obtido por CLUE com detecção por UV no limite de quantificação, 80 ng/mL .	112
Figura 40	Curva analítica para análise de tetraciclina por CLUE-TOF.	112
Figura 41	Espectro de massas da tetraciclina pelo método desenvolvido por CLUE-TOF.	113
Figura 42	Proposta de fragmentação da tetraciclina em ESI positivo.	114
Figura 43	CIE da tetraciclina protonada, obtido pelo método desenvolvido por CLUE-TOF. Observam-se os sinais da tetraciclina t_R 2,01 minutos e do seu epímero t_R 1,80 minutos.	114
Figura 44	Cromatograma da tetraciclina obtido por CLUE/UV 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	115
Figura 45	Espectro de massas da histamina obtido pelo método desenvolvido. $[M + H]^+$, m/z 112 e $[M + H - \text{NH}_3]^+$, m/z 95.	117
Figura 46	Estrutura da histamina protonada $[M + H]^+$ indicando a posição onde ocorre a quebra da ligação C-N para formar o íon $[M + H - \text{NH}_3]^+$, m/z 95.	118
Figura 47	Espectro de massas de alta resolução de amostra de vinho adicionada de padrão de histamina mostrando picos de mesma massa nominal da histamina.	118
Figura 48	CIE da histamina protonada m/z 112 em amostra de vinho adicionada de padrão, I, e amostra de vinho naturalmente contaminada, II.	119

Figura 49	CIE de histamina protonada em amostra de vinho. Não foi detectada histamina nesta amostra.	120
Figura 50	Sinal da histamina protonada na coluna XTerra, I e em duas colunas BEH ligadas em série II.	121
Figura 51	Curva analítica construída para análise de histamina em vinho.	124
Figura 52	CIE sobrepostos de ácidos orgânicos majoritários presentes em amostra de vinho tinto e suco de uva	129
Figura 53	CIE sobrepostos dos derivados do ácido cinâmico detectados nas amostras de vinho e suco de uva.	132
Figura 54	CIE sobrepostos dos derivados do ácido hidroxibenzóico encontrados nas amostras de vinho e suco de uva.	136
Figura 55	CIE sobrepostos dos flavonóis e flavanóis identificados nas amostras de vinho e suco de uva.	138
Figura 56	CIE sobrepostos das antocianinas identificadas nas amostras de vinho.	138
Figura 57	Estrutura dos flavonóis e flavanóis avaliados.	139
Figura 58	Estrutura geral das antocianinas e após reação de hidratação e adição de bissulfito.	140
Figura 59	CIE de resveratrol presente em amostra de vinho. Resveratrol livre na amostra t_R 5,00 min e resveratrol glicosilado t_R 4,33 e 4,71 min.	141
Figura 60	Espectro de massas do Resveratrol desprotonado, $[M - H]^-$ m/z 227, e resveratrol glicosilado $[M - H + 162]^-$ m/z 389.	141
Figura 61	Resveratrol desprotonado e seus análogos naturais glicosilados desprotonados, forma detectável nos EM.	142
Figura 62	Proposta de fragmentação do resveratrol glicosilado.	145
Figura 63	Estruturas do betacaroteno e da zeaxantina.	147
Figura 64	Espectros de VIS do betacaroteno (a) e da zeaxantina (b).	147
Figura 65	Espectro de massas do betacaroteno mostrando o íon molecular m/z 568, e um sinal bem pequeno referente à perda de tolueno m/z 444.	148
Figura 66	Espectro de massas da zeaxantina mostrando o íon molecular e a perda de tolueno m/z 476.	149
Figura 67	Proposta de fragmentação do betacaroteno liberando tolueno ($[M - 92]^+$).	151
Figura 68	Retinol e o fragmento detectável por CLUE-TOF, m/z 269.	153
Figura 69	Espectro de massas do retinol obtido a partir do padrão produzido no laboratório.	153
Figura 70	CIE sobrepostos de cianidinas e delphinidina de romã coelundo.	156
Figura 71	Espectro de massas da cianidina-diglicosídeo, liberando em etapas os açúcares substituintes.	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alguns métodos utilizados para análise de aflatoxinas.	59
Tabela 2	Alguns métodos utilizados para análise de cloranfenicol em alimentos.	61
Tabela 3	Alguns métodos utilizados para análise de melamina.	62
Tabela 4	Alguns métodos utilizados para análise de tetraciclina em alimentos.	63
Tabela 5	Alguns métodos utilizados para análise de histamina em alimentos.	64
Tabela 6	Alguns métodos utilizados para análise de fenólicos em matrizes naturais.	66
Tabela 7	Vinhos analisados quanto a presença e quantificação de histamina.	76
Tabela 8	Vinhos e sucos de uva analisados para ácidos orgânicos e fenólicos.	77
Tabela 9	Pontos da curva analítica de tetraciclina.	78
Tabela 10	Pontos da curva analítica de histamina.	79
Tabela 11	Economia de tempo e fase móvel proporcionada pelos métodos desenvolvidos.	91
Tabela 12	Parâmetros ótimos de fonte para análise de aflatoxinas em amendoim.	93
Tabela 13	Parâmetros ótimos de fonte ESI no modo positivo e no modo negativo encontrados para análise de cloranfenicol em mel.	98
Tabela 14	Parâmetros de fonte encontrados para análise de melamina.	105
Tabela 15	Parâmetros cromatográficos utilizados na análise de tetraciclina por CLUE-TOF.	109
Tabela 16	Parâmetros ótimos de fonte encontrados para análise de tetraciclina por CLUE-TOF.	110
Tabela 17	Gradiente desenvolvido para análise de tetraciclina por CLUE com detecção por UV.	111
Tabela 18	Valores de fonte obtidos para análise de histamina em vinho.	117
Tabela 19	Gradiente HILIC desenvolvido para análise de histamina em vinho.	123
Tabela 20	Valores de histamina encontrados nas amostras de vinho analisadas.	126
Tabela 21	Valores de fonte obtidos para análise de ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva.	128
Tabela 22	Gradiente cromatográfico desenvolvido para análise de ácidos orgânicos e fenólicos em vinho e suco de uva.	129
Tabela 23	Ácidos orgânicos identificados nas amostras pelo método desenvolvido.	130
Tabela 24	Resultado da análise de ácidos orgânicos das amostras. ND não detectado.	131
Tabela 25	Derivados do ácido cinâmico identificados nas amostras de vinho e suco de uva.	133
Tabela 26	Proporções de derivados cinâmicos encontrados nas amostras de	134

	vinho e suco de uva.	
Tabela 27	Derivados do ácido hidroxibenzóico identificados nas amostras de vinho e suco de uva.	136
Tabela 28	Proporções de derivados hidroxibenzóicos encontrados nas amostras.	137
Tabela 29	Flavonóides identificados nas amostras.	139
Tabela 30	Resveratrol encontrado nas amostras de vinho e suco de uva.	143
Tabela 31	Valores de fonte encontrados para análise de betacaroteno e zeaxantina.	147
Tabela 32	Valores de fonte encontrados para análise de retinol.	152
Tabela 33	Condições cromatográficas ótimas encontradas para análise de antocianinas.	154
Tabela 34	Parâmetros de fonte ótimos encontrados para análise de antocianinas.	155

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Cálculo da razão de distribuição de massas de um analito através do número de mols.	37
Equação 2	Cálculo da razão de distribuição de massas de um analito através do tempo de retenção do soluto e do tempo morto da fase móvel.	38
Equação 3	Resolução cromatográfica obtida através da seletividade, do número de pratos teóricos e da razão de distribuição de massas de um método.	38
Equação 4	Cálculo da seletividade.	38
Equação 5	Número de pratos teóricos de um método cromatográfico.	39
Equação 6	Cálculo da altura equivalente de prato teórico.	39
Equação 7	Cálculo do coeficiente de distribuição.	39
Equação 8	Equação de Van Deemter.	42

LISTA DE SIGLAS

α	Seletividade
\bar{u}	Velocidade linear da fase móvel
A	Difusão turbilhonar
ACN	Acetonitrila
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Ionização à pressão atmosférica
AR	Alta Resolução
B	Difusão longitudinal
C	Cinética de transferência de massa entre as fases cromatográficas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CDEM	Multiplicadora de elétrons de dinodo contínuo
CE	Comunidade Européia. "The Commission of the European Communities"
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI	Ionização química
CID	Dissociação induzida por colisão
CIE	Cromatograma de íon extraído
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com análise em sequência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CLUE-TOF	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo
C_M	Concentração do soluto na fase móvel
CP	Cromatografia em papel
cps	Contagens por scan
C_s	Concentração do soluto na fase estacionária
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
D_m	Razão de distribuição de massas ou fator de capacidade
EC	Eletroforese capilar
EI	Ionização por elétrons
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria de massas com análise em sequência
EM^n	Espectrometria de massas de múltiplos estágios
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	"Food and Drug Administration"
FI	Ionização por campo
FTICR	Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
h	Altura equivalente de prato teórico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HILIC	Cromatografia líquida de interações hidrofílicas
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
k'	Fator de capacidade ou razão de distribuição de massas
K_D	Coefficiente de distribuição

L	Comprimento da coluna
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MALDI	Dessorção; ionização a laser auxiliada por matriz
MALDI-TOF	Ionização por MALDI acoplada à análise por TOF
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MCP	Placa de multicanais
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
m/z	Razão massa carga
n	Número de pratos teóricos
n_M	Número de mols do analito na fase móvel
n_S	Número de mols do analito na fase estacionária
OMS	Organização mundial da saúde
PEG	Poli(etileno)glicol
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PTFE	Politetrafluoretileno, Teflon
Q	Espectrometria de massas por quadrupolo
QqQ	Espectrometria de massas sequencial por triplo quadrupolo
QTOF	Espectrometria de massas híbrida por analisadores quadrupolo e tempo de voo
Q3	Terceiro quadrupolo do QqQ
RASFF	Sistema Europeu de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais
RIA	Radioimunoensaio
RP	Fase reversa
R_S	Resolução cromatográfica
SEM	Multiplicação de elétrons secundários
SIM	Monitoramento de íon selecionado
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetrahidrofurano
t_M	Tempo morto
TOF	Tempo de voo
TIC	Cromatograma de íons totais
t_R	Tempo de retenção
TRAP	Armadilha de íons
UV/VIS	Ultra violeta/ visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE ALIMENTOS	21
2.2 ANÁLISE INSTRUMENTAL E ANÁLISE CONVENCIONAL	24
2.3 CROMATORAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	25
2.3.1 A cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia líquida tradicional	25
2.3.2 Equipamentos utilizados na CLAE	30
2.3.3 Eficiência da separação cromatográfica	37
2.3.4 O papel da coluna na separação	39
2.3.5 Efeito das altas pressões na separação	43
2.3.6 Tipos de colunas utilizadas atualmente: colunas de partículas totalmente porosas e colunas com partículas do tipo núcleo/casca ou core-shell.	44
2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	46
2.5 ACOPLAMENTO CLAE-EM, A INTERFACE	56
2.6 ANÁLISE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	58
2.6.1 Análise de aflatoxinas em amendoim	58
2.6.2 Análise de cloranfenicol em mel	60
2.6.3 Análise de melamina em leite	61
2.6.4 Análise de tetraciclina em leite	63
2.6.5 Análise de histamina em vinho	64
2.7 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS DE VINHO E SUCO DE UVA	65
3 OBJETIVOS	69
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 SOLVENTES ORGÂNICOS, ÁGUA, REAGENTES E PADRÕES	71
4.2 EQUIPAMENTOS	71
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	73
4.3.1 Preparo da amostra de amendoim para análise de aflatoxinas	73
4.3.2 Preparo da amostra de mel para análise de cloranfenicol	74
4.3.3 Preparo da amostra de leite para análise de melamina	74
4.3.4 Preparo da amostra de leite para análise de tetraciclina	75
4.3.5 Preparo da amostra de vinho para análise de histamina, ácidos orgânicos e fenólicos e suco de uva para análise de fenólicos	75
4.3.6 Preparo das amostras de betacaroteno, zeaxantina e retinol para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular	77
4.3.7 Preparo das amostras de antocianinas para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular	78

4.4 PREPARO DA CURVA ANALÍTICA PARA TETRACICLINA EM LEITE	78
4.5 PREPARO DA CURVA ANALÍTICA PARA HISTAMINA EM VINHO	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 ANÁLISE DA QUALIDADE DOS SOLVENTES ORGÂNICOS E DA ÁGUA	84
5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CLUE-TOF	88
5.2.1 Desenvolvimento dos métodos	88
5.2.2 Escolha das matrizes de alimentos e preparo das amostras	90
5.2.3 Desempenho dos métodos desenvolvidos	91
5.3 ANÁLISE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	93
5.3.1 Análise de aflatoxinas	93
5.3.2 Análise cloranfenicol em mel	97
5.3.3 Melamina	105
5.3.4 Tetraciclina	109
5.3.5 Análise de histamina em vinho	116
5.3.5.1 desenvolvimento do método cromatográfico para análise de histamina em vinho	120
5.3.5.2 avaliação da curva analítica e seu potencial para quantificação	124
5.3.5.3 análise das amostras de vinho	125
5.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS DE VINHO E SUCO DE UVA	127
5.4.1 Parâmetros de detecção e método cromatográfico desenvolvidos	128
5.4.2 Ácidos orgânicos	129
5.4.3 Fenólicos de vinho e suco de uva	132
5.5 ANÁLISE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PADRÕES CROMATOGRÁFICOS	146
5.5.1 Betacaroteno, zeaxantina	146
5.5.2 Retinol	152
5.5.3 Antocianinas	154
5.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	157
6 CONCLUSÃO	161

1 INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica com alta versatilidade, capaz de analisar substâncias com características bem distintas, desde aminoácidos - pequenas moléculas polares altamente solúveis em água, à carotenóides - apolares insolúveis em água. Quando acoplada à espectrometria de massas (EM) origina uma técnica com poder ainda maior de caracterização e quantificação de substâncias devido às suas características de sensibilidade e seletividade. Isso ocorre pela associação da alta capacidade de separação do CLAE e da capacidade de detecção e identificação dos analitos pelo EM através da razão massa/carga (m/z) dos íons originados pelo analito. Entretanto, no Brasil, ainda se utiliza amplamente, por exemplo, cromatografia de troca iônica com detecção por fluorimetria para análise de histamina em alimentos, ou a cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção de aflatoxinas, também em alimentos. Essas técnicas há muito já não são aceitas por órgãos mais exigentes como “The Commission of the European Communities” (CE) devido a confiabilidade dos resultados analíticos.

A CE (2002) estabeleceu uma norma que afirma que os métodos confirmatórios de análise devem fornecer informação estrutural dos analitos, sendo que a análise de diferentes analitos deve resultar em respostas diferentes. Técnicas com baixa seletividade, como as citadas acima podem não atender aos requisitos da norma devido à possibilidade de coeluição ou da existência de analitos com o mesmo cromóforo, que resultam em sinais iguais. Os fabricantes de equipamentos analíticos, buscando equipamentos cada vez mais seletivos, que pudessem atender aos requisitos de seletividade exigidos pela legislação modernizaram tanto os cromatógrafos líquidos, quanto os EM. A nova geração de equipamentos hifenados com analisadores de alta resolução (AR), sendo o representante mais utilizado o analisador por tempo de voo (TOF), prometem alcançar o desempenho analítico dos triplo quadrupolos (QqQ), que são os analisadores mais utilizados em rotinas analíticas para alimentos, mas com a vantagem da AR e da massa exata. Já a Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUE) é a evolução da CLAE e a está substituindo devido à maior rapidez das análises, economia de solvente e maior capacidade de separação.

A CLUE com colunas empacotadas com fases estacionárias confeccionadas com partículas porosas sub 2 μm , ou partículas *core-shell*, prometem uma

capacidade muito maior de separação, reduzindo o tempo de análise, o gasto de solventes e maior sensibilidade, além de potencializar o uso dos cromatógrafos líquidos acoplados aos EM por eliminar interferentes da amostra que inibem a ionização dos analitos sem a necessidade de passar por etapas de purificação. Seu fluxo ótimo reduzido em relação à CLAE convencional (0,1-0,4 mL/min contra 1 mL/min) propicia uma adequação melhor à fontes de íons do tipo eletrospray (ESI), que em geral trabalham com fluxo ótimo de no máximo 0,5 mL/min. Já a detecção por TOF permite uma visualização geral do perfil de uma amostra, pois apresenta desempenho melhor em relação aos QqQ quando estes trabalham em modo de varredura linear ("full scan"), sendo bem mais vantajoso quando a análise objetiva a prospecção de substâncias bioativas em uma amostra ou quando se está buscando um analito que não é o alvo primário da análise, fornecendo mais dados. Mesmo quando o foco são analitos alvo, o TOF se mostra mais vantajoso por fornecer dados de alta resolução (nem todo TOF trabalha com alta resolução, em alguns casos sacrifica-se a resolução em favor de uma velocidade de aquisição maior), além de informação sobre fragmentação, auxiliando na diferenciação de possíveis coeluições com interferentes de mesma massa nominal.

Apesar de se saber da necessidade de melhoria das técnicas, não basta simplesmente trocar os equipamentos de um laboratório e iniciar as análises. O uso de equipamentos mais seletivos dificulta a interpretação dos resultados pelo aumento da complexidade dos dados gerados. Existem ainda outros fatores que podem interferir nas análises como a inibição da ionização dos analitos devido à presença de interferentes da própria matriz ou de solventes, ou incapacidade dos equipamentos de fornecerem resultados exatos, precisos e altamente seletivos.

Observando-se o crescimento da utilização da CLUE e da espectrometria de massas de AR por TOF, que prometem mais rapidez e confiabilidade dos dados analíticos e da ainda pequena utilização destas técnicas nas análises de alimentos este trabalho faz uma avaliação das capacidades do CLUE-TOF, comparando com os métodos mais recentes da literatura que utilizam técnicas convencionais. O objetivo é verificar o seu potencial de utilização como técnica de rotina contribuindo para aumentar a rapidez, a simplicidade e a confiabilidade dos resultados obtidos por laboratórios analíticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE ALIMENTOS

O início da análise de alimentos pode ser creditado à necessidade do ser humano de conhecer a composição de sua comida e a influência que as substâncias presentes nos alimentos tinham sobre a promoção do crescimento do corpo, a manutenção do seu pleno funcionamento e o porquê de alguns alimentos, ao invés de promoverem saúde, causam doenças. Obviamente foi o desenvolvimento da Química moderna e da Bioquímica que possibilitaram essas descobertas, mas, ainda hoje, a modernização de técnicas analíticas e substituição de metodologias clássicas de análise por métodos instrumentais são responsáveis por acelerar e aprofundar as descobertas na área de alimentos.

Dwyer (1994) classifica a evolução das análises de composição de alimentos em quatro etapas, sendo o período compreendido entre elas uma revolução. Segundo o autor, a primeira revolução ocorreu no final do século XIX, quando Atwater iniciou seus estudos sobre como as substâncias presentes nos alimentos fornecem energia, e mostrou que o “combustível” responsável pela vida dos animais vem da alimentação. Somente este trabalho já fornece base para concluir que uma alimentação inadequada tem impacto direto na saúde de um indivíduo. A segunda revolução, segundo Dwyer (1994), ocorre quando da descoberta das vitaminas e minerais nos alimentos, e da influência que a sua deficiência no organismo tem no desenvolvimento de certas doenças, como o escorbuto, muito comum nos navegantes da época das Grandes Navegações que não tinham acesso à frutas frescas e pereciam devido à deficiência de vitamina C. A terceira revolução ocorre quando se verificou a necessidade de se conhecer melhor a associação entre doenças já há muito conhecidas, provocadas pela deficiência de nutrientes, mas também das novas doenças decorrentes de uma fome mundial de alimento em algumas sociedades e da industrialização destas, as doenças crônicas degenerativas provocadas por alimentos. Nessa revolução começa-se a identificar de forma mais detalhada a composição dos ácidos graxos das gorduras e óleos, a proporção e o tipo de fibras, aminoácidos, e vitaminas em cada alimento. A quarta revolução ocorre no final do século passado, quando se passa a estudar não somente os nutrientes presentes na dieta, mas também as outras substâncias que tem efeito indireto na

saúde, como os compostos bioativos, que antes eram considerados objeto de estudo apenas dos químicos de produtos naturais.

Nota-se, por esse histórico, que o estudo da composição dos alimentos vai além da simples quantificação dos carboidratos, lipídeos e proteínas.

Inclui-se também no escopo das análises de alimentos o controle da presença de resíduos e contaminantes, que afetam diretamente a saúde de maneira negativa. Nesta categoria são incluídos resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários, Algumas dessas substâncias podem ser legalmente utilizadas durante o cultivo ou criação, mas não devem estar presentes (ou presentes em baixíssimos níveis) no produto comercializado. Outros representantes dessa categoria são as substâncias de uso proibido, como o antimicrobiano cloranfenicol e o inseticida dicloro-difenil-tricloroetano, mais conhecido como DDT. Estes não podem ser encontrados nos alimentos. Já os contaminantes são substâncias naturalmente encontradas nos alimentos, mas devido ao seu risco à saúde não devem ultrapassar certos limites. Em todos os casos o controle analítico da qualidade dos alimentos é imprescindível não só para garantir a saúde dos consumidores, mas para resguardar economicamente os produtores e os distribuidores, já que muitos países possuem legislações que exigem controles rígidos para as substâncias classificadas como perigosas para a saúde. Países exportadores de alimentos como o Brasil podem ter seu comércio exterior seriamente afetado se não cumprir as exigências de seus clientes. Normalmente, uma declaração pública de não conformidade pode minar as parcerias econômicas de um país por gerar desconfiança entre os outros clientes.

Apesar de o Brasil ser um dos grandes produtores mundiais de alimentos, o país também precisa importar alguns tipos de produtos, muitas vezes insumos para a produção industrial de alimentos. Como comprador a preocupação se volta para a saúde dos consumidores e dos profissionais que manipulam esses produtos. Podem ser citados como exemplo os casos de adulteração de leite e derivados com melamina na China (VEJA, 2010), que ganharam notoriedade mundial por envolver alimentos voltados para o consumo infantil.

A União Européia possui um sistema de comunicação de alertas de risco envolvendo alimentos, cujo objetivo é “prevenir perigos ao nível da segurança alimentar, antes que estes possam causar prejuízos aos consumidores” (RASFF, 2013). Esse sistema é chamado de Sistema de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF, sigla em inglês). Uma busca no

portal RASFF (RASFF, 2013) retornou 1056 notificações envolvendo alimentos com origem no Brasil. Essas notificações são relacionadas ao período entre 1998 e 2013 e em sua maioria envolvem a contaminação por *Salmonella spp.*, aflatoxinas e medicamentos veterinários.

As notificações RASFF compreendem alertas contra produtos que circulam em território europeu, que podem ou não estar disponíveis no comércio. O sistema possui várias formas de monitoração como os alertas emitidos em fronteiras (pontos de importação), ou a partir de algum evento adverso pós consumo. Após as notificações os alertas são avaliados e se necessário os alimentos envolvidos são recolhidos, e podem até ser devolvidos ao exportador.

Os recentes embargos à carne brasileira, decretados por países como Rússia, Ucrânia, Estados Unidos da América (EUA), Japão, China, (MACEDO, 2010; GARCEZ, 2012; ECONOMIA UOL, 2013) tiveram bastante repercussão mundial, que acaba provocando um efeito cascata, fazendo com que o medo de comprar alimento comprometido amplie o embargo aos países que não receberam esses produtos comprometidos, pela simples perda da confiança nos alimentos brasileiros (GARCEZ, 2012; ECONOMIA IG, 2012).

Esses fatos reforçam a importância do país ter uma política de segurança de alimentos, que garanta um controle de qualidade tanto na fonte produtora, monitorando e controlando o uso de medicamentos veterinários, pesticidas, substâncias de uso proscrito e a própria produção, quanto nos alimentos disponíveis no comércio (BERNAL et al., 2011). Apesar disso não tem se observado muitos avanços nessa direção. Em 2012 foram apenas 14956 análises de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal para todo o país, encontrando 69 não conformidades (BRASIL, 2013). Comparando-se com o ano de 2010, quando foram realizadas quase 20000 análises, houve uma redução significativa. Esses resultados se mostram muito aquém do necessário, principalmente quando se compara com o número de não conformidades encontradas nos alimentos brasileiros exportados para a Europa (RASFF, 2013).

Apesar de o investimento ser alto para se estabelecer essa cadeia de segurança de alimentos, esse se faz necessário para garantir um comércio que chega a movimentar 600 milhões de dólares por mês somente com exportações de carne bovina (ABIEC, 2013). Outros custos também podem ser reduzidos como os

gastos em saúde devidos à exposição dos trabalhadores do campo e dos consumidores aos xenobióticos tóxicos.

2.2 ANÁLISE INSTRUMENTAL E ANÁLISE CONVENCIONAL

Nas análises de alimentos se procura determinar a natureza e a quantidade de uma determinada substância como, por exemplo, a quantificação de histamina em amostras de vinho, ou de várias substâncias como, por exemplo, nas determinações da composição centesimal. Em ambos os casos podem ser utilizados dois tipos de análise: análise instrumental que envolve a utilização de técnicas sofisticadas e a análise convencional, baseada em gravimetria e volumetria (CECCHI, 2003).

Apesar de amplamente utilizada em todo o mundo a análise convencional é menos seletiva, mais demorada e em alguns casos mais dispendiosa que a análise instrumental. A baixa seletividade pode trazer consequências drásticas, pois um método, ou técnica, não seletivo não é capaz de distinguir o analito alvo de interferentes, gerando resultados falso positivos, ou sendo aproveitados por fraudadores para aumentar o teor de uma determinada substância em uma amostra. Em 2008 6 crianças morreram e outras 300.000 foram intoxicadas na China devido à fraude de produtos derivados do leite com melamina (VEJA, 2010; FOLHA, 2008), uma substância nitrogenada que quando adicionada ao alimento gera resultados aumentados do teor de proteínas do produto.

A análise do teor de proteínas em alimentos normalmente é feita pelo método de Kjeldal, que mede indiscriminadamente, a quantidade de nitrogênio presente em uma amostra (CECCHI, 2003). Devido a estas características, a utilização de métodos convencionais é cada vez menor, e tende a ser totalmente substituída por métodos instrumentais. Mesmo dentre as análises instrumentais, vê-se que as técnicas analíticas automatizadas como a cromatografia gasosa (CG) e a CLAE tem aos poucos substituído outras técnicas analíticas instrumentais, como a espectrofotometria, em laboratórios que realizam análises de substâncias orgânicas como rotina. Isso se deve principalmente ao fato das técnicas mais modernas diminuírem ainda mais o tempo de uso da mão-de-obra, o uso de solventes, e oferecerem maior seletividade, e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) mais baixos. Essas características levam à obtenção mais rápida dos resultados,

diminuição os custos de análise, e maior confiabilidade nos dados obtidos, devido à maior seletividade.

Dentre essas técnicas automatizadas, a que tem maior importância, e que tem alcançado maior crescimento é sem dúvida a CLAE. Provavelmente esse fato se deve à versatilidade da técnica, capaz de analisar substâncias com características bem distintas, que vão desde aminoácidos, pequenas moléculas polares altamente solúveis em água, a carotenóides, apolares insolúveis em água. Quando acoplada à EM, a CLAE ganha um poder muito maior de caracterização e quantificação de substâncias, devido às suas características únicas de sensibilidade e seletividade (GUILLARME; VEUTHEY, 2013).

A análise de proteínas por CLAE, por exemplo, é muito mais confiável que a análise convencional pelo método de Kjeldal, pois tem a capacidade de avaliar individualmente as proteínas ou peptídeos através do teor de aminoácidos (CAMPOS, 2005) diferenciando-os dos outros compostos nitrogenados presentes no alimento, como vitaminas ou mesmo contaminantes, como a melamina.

2.3 CROMATORAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

2.3.1 A cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia líquida tradicional

Cromatografia, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, sigla em Inglês), é um método físico de separação de misturas em que os componentes dessa mistura se distribuem em duas fases durante o processo. Uma fixa, chamada estacionária e outra que se movimenta através da primeira, chamada móvel (ETTRE, 1993).

O desenvolvimento da cromatografia é creditado ao botânico Mikhael Semenovich Tswett, que em 1906 publicou dois artigos na principal revista de botânica da época a *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, revista da Sociedade Alemã de Botânica. Tswett publicou seu trabalho que consistia na separação, identificação e quantificação dos pigmentos de folhas em um sistema que consistia de uma coluna de vidro, preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel (ETTRE, 2003). Durante os experimentos, a mistura de cor verde se separou em várias bandas de cores diferentes, originando o nome do método (Figura 1). O termo cromatografia se

origina dos radicais gregos *chroma*, cor, e *grafie*, escrita (LÁZARO DE LA TORRE, 2013apudCOLLINS, 1997). Entretanto, uma alusão ao sobrenome do criador do método pode também ser feita, pois “tswett” em russo, língua natal dos pais do botânico, significa cor. Apesar do nome, na maioria das vezes não é possível visualizar as substâncias separadas por cromatografia, pois isso depende da capacidade das substâncias de refletir a luz em comprimentos de onda visíveis. Para esta função, se utiliza após a separação cromatográfica detectores que fazem a identificação e a quantificação dos compostos separados através de suas propriedades físicas.

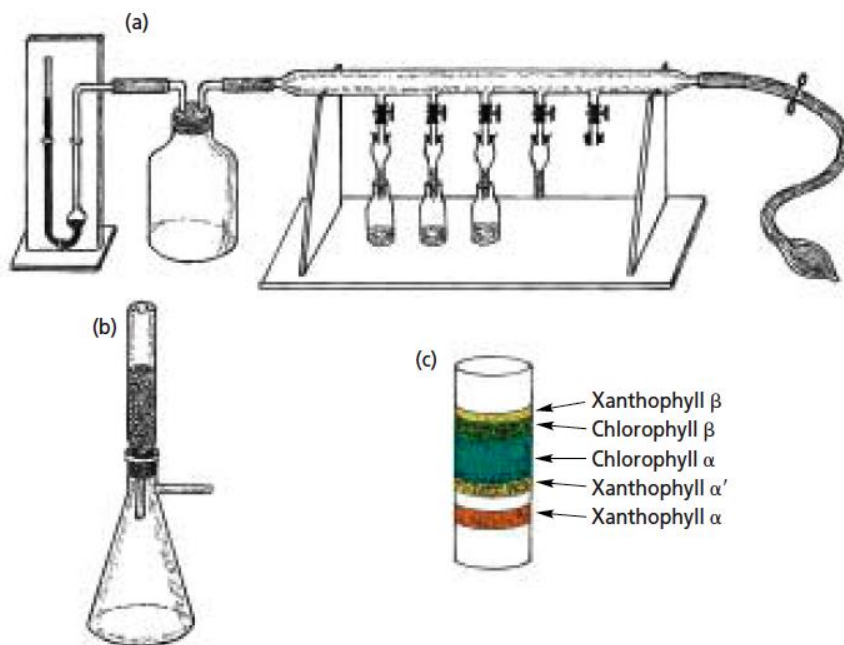


Figura 1. Esquema do sistema de cromatografia criado por Tswett. Fonte: ETTRE (2003).

A técnica criada por Tswett para separar os pigmentos da folha é conhecida por cromatografia líquida em coluna, onde a fase móvel consiste em um líquido que percola a fase estacionária (ETTRE, 1993), cujo suporte é uma coluna, geralmente de vidro ou de aço. Entretanto, atualmente existem dezenas de processos cromatográficos e técnicas afins, podendo ser classificados de acordo com vários critérios, como tipo de fase móvel, o suporte da fase estacionária, a natureza da fase móvel, a pressão necessária para o deslocamento da fase móvel, etc. (ETTRE, 1993; AQUINO NETO; SOUZA NUNES, 2003).

Segundo o próprio Tswett, a separação dos compostos de uma mistura se dá devido à migração diferencial desses pela coluna durante a o processo cromatográfico (ETTRE, 2003). Essa migração diferencial ocorre porquê substâncias diferentes migram através da coluna com velocidades diferentes, dependentes da interação a nível molecular das substâncias com a fase estacionária e com a fase móvel. De maneira geral, quanto maior for a interação de uma substância com a fase estacionária, mais lenta será a sua migração através da coluna. A velocidade de migração dos analitos pode ser alterada modificando-se vários parâmetros cromatográficos, que afetam a distribuição dos analitos nas duas fases como o tipo de fase estacionária, a composição e o tipo de fase móvel e a temperatura em que a separação ocorre. Com isso consegue-se uma grande versatilidade para realizar umavseparação utilizando-se a cromatografia líquida. Talvez seja essa a principal razão da técnica ter se tornado nos últimos anos a mais importante técnica de separação em diversas áreas como farmacêutica, biológica, ambiental e análise de alimentos (GUILLARME; VEUTHEY, 2013). Essas áreas tem em comum matrizes bastante complexas que dificultam o trabalho de separação e identificação de substâncias de interesse, os analitos.

Para Snyder e Kirkland (1979) a cromatografia líquida moderna (que na verdade já não é tão moderna assim) é realizada em equipamentos que utilizam altas pressões e possuem alta eficiência de separação, chamados cromatógrafos líquidos de alta eficiência. Snyder e Kirkland consideram como tradicionais a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia em papel (CP) e a cromatografia líquida em coluna aberta. Apesar de antigas, essas técnicas são bastante práticas e são facilmente aplicáveis em um variedade de situações. A CCD e a CP são muito mais simples e baratas que a cromatografia líquida em coluna tradicional e moderna. A fase estacionária pode ser adquirida pronta para receber a amostra, que é aplicada na forma de pontos na base do suporte contendo a fase estacionária. Poucos microlitros de amostra são necessários nessa etapa, em seguida coloca-se a placa contendo a amostra, na posição vertical, em uma cuba cromatográfica fechada contendo solvente de forma que este não cubra o ponto de aplicação da amostra. A fase móvel elui subindo a placa cromatográfica e ao final do processo seca-se a mesma e borrifa-se uma solução contendo um reagente cromogênico para revelar as bandas dos componentes separados. Na CLAE essas bandas formam os picos do cromatograma.

A CCD e a CP fornecem resultados muito mais rápidos e promovem uma separação muito mais eficiente que a técnica criada por Tswett, contudo, assim como a cromatografia líquida tradicional em coluna essas técnicas são pouco reprodutíveis, principalmente quantitativamente, de difícil automação e a eficiência de separação é bastante inferior à CLAE e a CG (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

O desenvolvimento da CLAE, e mais recentemente a sua evolução a cromatografia líquida de ultra alta eficiência/ pressão (UHPLC, sigla em inglês), simplificou e agilizou as análises, proporcionou maior reprodutibilidade dos resultados e maior exatidão quantitativa, pois no processo clássico, a análise é realizada em colunas abertas, empacotadas manualmente, com o solvente sendo bombeado lentamente, através da coluna, sendo que na maioria das vezes a caracterização e quantificação dos analitos era realizada manualmente utilizando-se um espectrofotômetro, colorímetro, etc. Com a CLAE todo o processo foi automatizado, e o que antes levava dias pode ser feito em apenas algumas horas, isso levou a uma grande economia de tempo, de mão-de-obra e de materiais, principalmente solventes (AQUINO NETO; SOUZA NUNES, 2003). A Figura 2 mostra um equipamento de CLAE e a estrutura para realizar a cromatografia líquida convencional em coluna aberta.

I



II



Figura 2. Equipamento de CLAE (I) e cromatografia em coluna aberta (II). Fonte: Arquivo pessoal.

A cromatografia líquida pode ser classificada de acordo com o objetivo da separação em dois tipos: preparativa e analítica.

Na cromatografia analítica o objetivo é identificar e quantificar um determinado analito, nesses casos não há preocupação com o efluente da análise, e este provavelmente será descartado. Já na cromatografia preparativa o objetivo é separar e purificar compostos de interesse, recolhendo-os ao final da análise. Pode-se utilizar um coletor de frações no final do sistema para essa finalidade. Nesse tipo de análise a escala é determinada pela quantidade de amostra processada, que pode ir de alguns microgramas visando a obtenção de enzimas, ou quilogramas, no caso da obtenção industrial de insumos farmacêuticos. Como em geral a cromatografia é mais cara que as formas clássicas de separação e purificação, como precipitação, filtração e recristalização, em geral a técnica fica restrita a substâncias com alto valor agregado e de difícil purificação.

2.3.2 Equipamentos utilizados na CLAE

Os sistemas cromatográficos modernos consistem em seis unidades básicas. Estas podem ser vendidas separadamente, permitindo ao operador configurar o sistema de acordo com as suas necessidades, são os chamados sistemas modulares, ou vendidas em blocos únicos, permitindo apenas pequenas mudanças, como, por exemplo, a troca de detectores. Essas unidades são: 1) sistema de suprimento de fase móvel; 2) sistema de bombeamento de fase móvel; 3) injetor de amostra; 4) termostato para coluna; 5) detector e 6) sistema de aquisição e processamento de dados (SNYDER; KIRKLAND, 1979; AQUINO NETO; SOUZA NUNES, 2003).

1) Sistema de suprimento de fase móvel: São basicamente reservatórios de vidro de borosilicato (cuja marca Pyrex costuma ser referência), ou aço inox, sendo os últimos menos utilizados por serem suscetíveis à corrosão. Normalmente, na entrada de cada canal de solvente há um filtro de placa sinterizada ou de aço inox, para evitar a sucção de material particulado para a linha. O solvente para CLAE necessita ser degaseificado. Esse cuidado deve ser especial quando se utiliza soluções aquosas, pois estas contêm oxigênio e nitrogênio dissolvido em relativamente grande quantidade e a presença desses gases pode favorecer a formação de bolhas no sistema, que geram instabilidade, perda de eficiência na separação e falta de reprodutibilidade do tempo de retenção (t_R) dos analitos, principal parâmetro de identificação das substâncias. Para a retirada dos gases, costuma-se integrar ao sistema de fornecimento de solvente um degaseificador, que consiste de um equipamento contendo tubos semipermeáveis (que permitem a passagem apenas de gases) que ficam inseridos numa câmara sob vácuo. Para aumentar a eficiência da degaseificação costuma-se submeter os reservatórios de fase móvel ao ultrassom, antes de leva-los ao CLAE.

2) Sistema de bombeamento de fase móvel: Existem vários tipos de bombas de solvente utilizadas em CLAE. As características mais importantes dessas bombas são a capacidade de fornecer um fluxo estável de solvente e isento de pulsos, pois estes podem causar perturbação no detector (isso pode ser provocado também por bolhas), atrapalhando a análise dos picos no cromatograma, e a capacidade de trabalhar com gradiente, que é a modificação da composição da fase móvel durante a análise cromatográfica. Os tipos mais utilizados são:

"Positive Displacement", cujo principal exemplo desse tipo de bomba é a bomba seringa. Nessas bombas, não há um fluxo contínuo de solvente. As bombas são previamente enchidas com solvente, que então, é empurrado por um êmbolo através da coluna (Figura 3). Apesar de operarem com um volume fixo, e por isso muito limitado de solventes, esses sistemas são capazes de fornecer um fluxo isento de pulsação, bastante estável. Podem funcionar com gradiente, mas apenas de alta pressão.



Figura 3. Bomba "Positive Displacement" (bomba seringa). Fonte: Ms4sale (2013).

"Reciprocating Pumps", ou bombas recíprocas, são os tipos de bombas mais utilizados em CLAE. Constituem-se de pelo menos um pistão e duas "check valves", uma de entrada e outra de saída. A função das "check valves" é evitar o refluxo de solvente. São "autopurgantes", pois conseguem fazer a sucção do líquido mesmo com a câmara do pistão seca e sem vácuo. São muito eficientes, mas seu fluxo é bastante pulsado, pois o bombeamento de fase móvel é intermitente. Outra desvantagem é serem extremamente sensíveis a sólidos, como sais oriundos de tampões, que danificam os pistões e os selos retentores. Bombas recíprocas de pistão simples geram muito ruído no detector devido à pulsação. Esse problema foi resolvido com o desenvolvimento das bombas de pistão duplo e as bombas de enchimento rápido ou acumuladoras, que também possuem dois pistões. Essas bombas são desenvolvidas de forma a fornecerem um movimento linear do pistão durante a compressão do solvente e seu bombeamento, mas com um súbito movimento de retorno, de forma a reduzir os pulsos. Nas bombas com sistema de acumulação uma das bombas é responsável por enviar o solvente à coluna, e possui um fluxo de bombeamento pequeno, exemplo: 1 mL/min. A outra possui uma

capacidade de bombeamento bem maior, exemplo: 100 mL/min, e ao mesmo tempo que enche a bomba primária também envia solvente para a coluna, reduzindo dessa forma a pulsação na fase de enchimento da primária. Já nas bombas recíprocas com pistão duplo de cabeças gêmeas os pistões trabalham em sintonia, sendo que, quanto o pistão de uma cabeça está no ciclo de enchimento, o da outra está bombeando para a coluna. Esse sistema possibilita uma melhor atenuação da pulsação, em compensação, são mais caros. Essa diversidade de tipos de bombas recíprocas, com características diferentes como atenuação de pulsos, precisão de fluxo, ou pressão, possibilita aos fabricantes construir cromatógrafos com diferentes características, realçando-as de forma a direcioná-los para um determinado campo de aplicação. A seleção do volume de solvente bombeado pode ser feita de duas formas nesse tipo de bomba, variando-se o volume de cada ciclo do pistão ou o número de ciclos. No início de cada ciclo, antes do solvente ser forçado contra a cabeça da coluna, o pistão realiza a compressão do solvente à pressão atmosférica até que a pressão deste se iguale à pressão encontrada na cabeça da coluna. Nesse momento o líquido passa a percolar a fase estacionária. A compressibilidade do solvente pode afetar o fluxo informado pelo sistema ao operador e a proporção dos solventes quando o próprio sistema faz a mistura, principalmente nos sistemas modernos com volume interno (volume morto) reduzido. Por isso é importante informar ao sistema quais solventes são utilizados na fase móvel para que seja feita a compensação necessária.

Além das configurações de bombas com dois pistões os sistemas cromatográficos atuais possuem também atenuadores de pulso, que funcionam "na linha" como se fossem capacitores em um circuito elétrico, acumulando durante a etapa de bombeamento e liberando a carga na etapa de enchimento (Figura 4).

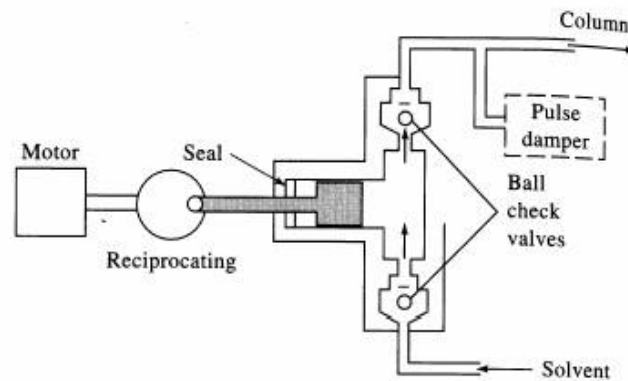


Figura 4. Esquema de uma bomba de pistão simples do tipo "reciprocating". Fonte: Monzir-pal.net (2013).

"Bombas diafragmáticas". Nesse sistema o solvente não fica em contato direto com os pistões. O pistão gera pressão em um diafragma, que então empurra o solvente que fica em contato com o outro lado do diafragma, numa câmara. Os diafragmas possuem uma superfície muito grande em relação ao volume bombeado, logo, é necessário um curso bem pequeno no pistão para bombear um volume significativo de solvente. Dessa forma, o pistão pode desenvolver altas frequências de oscilação, conseqüentemente reduzindo o efeito da pulsação. Nesse tipo de bomba a cavidade formada pelo diafragma para bombear o solvente costuma ser bem grande, aumentando o volume morto da bomba, resultando numa demora considerável na troca da composição da fase móvel quando se trabalha com gradientes. Esse efeito é bastante crítico em cromatógrafos analíticos. Por isso esse tipo de sistema costuma ser utilizado apenas em cromatografia preparativa.

"Bombas pneumáticas". Nas bombas pneumáticas o pistão é movimentado com ar. Os pistões são construídos de forma a promover uma amplificação da pressão aplicada pelo ar no solvente bombeado, sendo esses sistemas capazes de gerar altas pressões. Devido a sua complexidade e tamanho são pouco utilizados em laboratórios.

A presença de "check valves" em cromatógrafos não é característica estrita dos sistemas que utiliza bombas recíprocas. Bombas diafragmáticas e pneumáticas também submetem a fase móvel a refluxos e precisam de válvulas que impeçam o retorno do solvente. As "check valves" modernas são construídas num corpo de aço inox, politetrafluoretileno (PTFE, amplamente conhecido pela marca Teflon), ou safira. Esse corpo acomoda uma esfera de safira. Essa esfera se acomoda no corpo

da "check valves" durante o contra fluxo do solvente, evitando o seu retorno, e é empurrada para frente durante o fluxo, permitindo a passagem do solvente pelas suas laterais.

O sistema de bombeamento é altamente sensível a partículas presentes no solvente. Essas partículas podem ser provenientes de resíduos vindos do preparo e da manipulação de solventes, ou de sais, propositalmente dissolvidos para se trabalhar com tampões nas fases móveis. Sais precipitados ou outras partículas não solubilizadas danificam os sistemas internos das bombas, levando à vazamentos e queda na pressão do sistema, em alguns casos podem ser danificados até mesmo os pistões (podem ser "riscados").

Acoplado às bombas os cromatógrafos atuais possuem também um sistema de mistura de solventes. Basicamente são de dois tipos esses sistemas, o de baixa pressão, onde a mistura de solventes é feita através de uma válvula seletora de solvente e um misturador posicionado antes da bomba, e o de alta pressão, onde cada canal de solvente possui a sua bomba, e a seleção da proporção dos solventes é feita através do fluxo de cada uma dessas bombas, que é, então, enviado a um misturador. Os sistemas de alta pressão são mais simples de construir, contudo, como é necessária uma bomba para cada canal de solvente o sistema fica mais caro. Normalmente sistemas com misturas de alta pressão são binários (daí utiliza-se apenas duas bombas), enquanto que os de baixa permitem misturas quaternárias ou de mais solventes. Nos sistemas de baixa pressão, quanto menor o volume interno das bombas, mais rápida é a troca do gradiente na coluna, pois um menor volume de solvente com a composição antiga tem de ser transferido para a coluna antes do novo gradiente. O volume da câmara de mistura também deve ser pequeno para não incorrer no mesmo problema. Já nos sistemas de alta pressão, o tempo de mudança de gradiente é influenciado apenas pelo volume do sistema situado entre a bomba e a cabeça da coluna.

3) Injetor de amostra. O "injetor seringa" funciona como os sistemas de injeção de CG. Na maior parte desses sistemas o bombeamento do solvente é interrompido, para que a injeção seja feita sob pressão atmosférica. Como a dispersão da amostra no solvente é pequena, a eficiência da separação não é afetada.

"Válvulas de amostragem". Em sistemas contendo válvulas de amostragem, a amostra é injetada na coluna por meio de válvulas que possuem dois discos, em

geral de cerâmica e/ ou PTFE, que deslizam entre si rapidamente para inserir a amostra no sistema sem a necessidade de se interromper o fluxo. Esses discos são o rotor e o estator. A amostra é inserida num sistema contendo um "loop" de volume fixo bastante preciso. O mecanismo de deslizamento dos discos faz com que o solvente que vem das bombas, ao passar pela válvula de injeção, tem o seu caminho alterado para passar pelo "loop" de amostragem, carregando consigo a amostra para dentro da coluna. O deslizamento dos discos é feito num movimento único e rápido, do contrário a amostra é inserida fracionada, gerando mais de uma banda para o mesmo analito.

Na posição "normal" de funcionamento das válvulas de amostragem, o solvente está constantemente passando pelo "loop" de amostragem, sejam elas automáticas ou manuais. A válvula só deve ser colocada na posição de "by pass" durante a amostragem (introdução de amostra no "loop" de amostragem). Dessa forma se garante que nenhum resíduo de amostra permaneça no "loop" e contamine a análise seguinte. Para que não haja vazamentos, as partes móveis entre si devem estar fortemente pressionadas uma contra a outra. Quanto maior a pressão do sistema, mais firmemente devem ser presas essas partes. A união entre o rotor e o estator deve ser capaz de suportar pressões acima de 3000 psi, em cromatógrafos convencionais, CLAE, ou acima de 10000 psi, nos caso dos CLUE (MALDANER; JARDIM, 2009).

Assim como as bombas, as válvulas de injeção também são extremamente sensíveis à presença de partículas na solução, seja ela a mistura de solventes enviada pelas bombas ou a solução de amostra. Se no momento da injeção, quando há a rotação entre as duas partes da válvula para fazer a transferência da amostra para a coluna houver partículas no sistema, pode haver danificação dos discos do rotor e do estator, provocando riscos que levam à vazamentos, perda de pressão, e conseqüentemente perda de eficiência de separação e reprodutibilidade.

As válvulas de amostragem podem ser montadas em sistemas de injeção automático de amostra.

A Figura 5, mostra uma válvula de amostragem manual.



Figura 5. Injetor Rheodyne manual. Fonte: Laserchrom (2013).

4) Termostato para coluna. Os termostatos, ou fornos de coluna são uma das partes mais simples de um cromatógrafo líquido. Constituem apenas uma câmara com isolamento térmico e uma resistência para aquecimento. Apesar de sua simplicidade são extremamente importantes, pois a temperatura de separação é um dos fatores que afetam a eficiência da separação cromatográfica, sendo desejável que essa temperatura possa ser controlada pelo operador e esteja livre de influências da variação da temperatura ambiente.

5) Detector. A criação da cromatografia líquida moderna, realizada em cromatógrafos, só foi possível com o desenvolvimento de detectores que pudessem ser acoplados em linha com o efluente da coluna. Esses detectores são os responsáveis por medir propriedades físicas dos analitos, e através destas medidas fornecer um sinal que pode ser interpretado pelo analista. Dependendo da propriedade a ser medida utiliza-se um tipo específico de detector.

Os equipamentos que fazem a detecção precisam identificar e quantificar os solutos analisados em um volume muito menor que o necessário para eluir essas substâncias da coluna. Com essa informação, constrói-se um gráfico com a variação da concentração desses solutos em função do tempo de eluição, obtendo-se assim o cromatograma, que é o resultado de uma análise cromatográfica. As principais informações de um cromatograma são o tempo de eluição do analito e a área do pico que este forma, caracterizados pelo t_R e área do pico, respectivamente. Substâncias iguais possuem t_R iguais e a área do pico é proporcional à concentração do analito, quando a análise é realizada dentro da faixa linear de trabalho.

Com a evolução dos equipamentos de cromatografia, e a conseqüente diminuição do volume morto dos sistemas, a dificuldade na construção de detectores

que acompanhassem essa evolução foi aumentada, porque eles também precisaram ter seus volumes internos de tubulação e da própria célula de detecção diminuídos. Entretanto, diminuindo-se o volume da célula de detecção perde-se sensibilidade, segundo a Lei de Beer. Para manter-se a sensibilidade, ou até mesmo aumentá-la foi necessária a evolução na tecnologia envolvida na construção dos sistemas ópticos e fotométricos dos detectores (MALDANER; JARDIM, 2009; SPAGGIARI et al., 2013).

Os primeiros detectores para CLAE foram o detector de índice de refração, que mede a alteração no índice de refração da fase móvel contendo o soluto e a compara com o índice de refração da fase móvel pura, e o detector de condutividade, que mede a variação na condutividade da fase móvel em função da concentração do analito.

Os detectores de luz ultra violeta/ visível (UV/VIS) medem a quantidade de luz absorvida por substâncias que tem a capacidade de absorver radiação eletromagnética nos comprimentos de onda de 180 a 800 nm. Normalmente analitos com essa capacidade possuem uma ou mais ligações duplas ou pares de elétrons livres. A relação entre a concentração do soluto na solução e a quantidade de luz absorvida é dada pela Lei de Beer. Os detectores baseados na absorção UV/VIS são de longe os mais utilizados em CLAE.

2.3.3 Eficiência da separação cromatográfica

A eficiência de uma separação cromatográfica pode ser medida de diversas formas (SNYDER; KIRKLAND, 1979). Uma delas é verificar a distribuição das moléculas entre as fases calculando-se a razão de distribuição de massas (D_m).

Através das Equações 1 e 2 pode-se verificar a estreita relação do t_R com a distribuição das moléculas entre as duas fases.

Equação 1. Cálculo da razão de distribuição de massas de um analito através do número de mols.

$$D_m + 1 = (n_S + n_M) / n_M$$

Equação 2. Cálculo da razão de distribuição de massas de um analito através do tempo de retenção do soluto e do tempo morto da fase móvel.

$$D_m = (t_R - t_M) / t_M$$

Onde n_S é o número de mols do analito na fase estacionária, n_M é o número de mols do analito na fase móvel e t_M é o tempo que a fase móvel demora para atravessar a coluna.

Outros dois parâmetros cromatográficos são importantes na compreensão dos fenômenos que influenciam uma separação: fator de separação, ou seletividade (α) e número de pratos teóricos (n). Juntos com D_m (nesse caso, considerando que o D_m dos picos adjacentes é muito próximo, utiliza-se o valor médio) formam a Equação 3, de onde pode-se obter a resolução (R_S), ou grau de separação de uma separação cromatográfica.

Equação 3. Resolução cromatográfica obtida através da seletividade, do número de pratos teóricos e da razão de distribuição de massas de um método.

$$R_S = (1/4)(\alpha-1)^{\sqrt{n}}[D_m / (1+ D_m)]$$

Para melhor compreender a influência dos parâmetros cromatográficos na R_S pode-se dividir a Equação 3 em três termos, de acordo com os parâmetros cromatográficos citados acima.

Seletividade, nesse caso, é a capacidade de uma determinada fase móvel de eluir seletivamente um pico em detrimento do outro para uma determinada coluna. Varia de acordo com o tipo de solvente utilizado na fase móvel, ou tipo de fase estacionária. É altamente influenciada pelos tipos de interações químicas dos analitos com ambas as fases (PERIAT et al., 2013). Pode ser obtido pela Equação 4.

Equação 4. Cálculo da seletividade.

$$\alpha = t'_{R2} / t'_{R1}$$

Onde t'_{R2} e t'_{R1} são os tempos de retenção corrigidos ($t_R - t_M$) do segundo e do primeiro pico, respectivamente.

O número de pratos teóricos é um valor numérico que mostra a relação entre o t_R e a largura de um pico. Pode ser calculado a partir da Equação 5 utilizando-se as informações de um cromatograma.

Equação 5. Número de pratos teóricos de um método cromatográfico.

$$n = 16 (t_R/w_b)^2 = 5,545 (t_R/w_h)^2$$

Onde w_b e w_h são a largura do pico na base e a meia altura, respectivamente.

Pela Equação 6 pode-se calcular a altura equivalente de um prato teórico, que é a forma de expressar a unidade efetiva de separação de uma coluna.

Equação 6. Cálculo da altura equivalente de prato teórico.

$$h = L/n$$

Onde L é o comprimento da coluna.

A razão de distribuição de massas, presente no terceiro termo da Equação 3, relaciona-se com o coeficiente de retenção ou coeficiente de distribuição (K_D), dado pela Equação 7, e altera-se de acordo com a força do solvente, que é a capacidade de um solvente de eluir os solutos de uma amostra devido à sua polaridade. Na cromatografia de exclusão por tamanho não se pode alterar a migração das bandas dos analitos pela força do solvente, pois nesse tipo de cromatografia o t_R está diretamente relacionado com a capacidade dos solutos de entrarem nos poros de diferentes tamanhos da fase estacionária.

Equação 7. Cálculo do coeficiente de distribuição.

$$K_D = C_S/C_M$$

Onde C_S é a concentração do soluto na fase estacionária e C_M a concentração do soluto na fase móvel.

2.3.4 O papel da coluna na separação

Os principais agentes que atuam na separação cromatográfica são a fase móvel e a fase estacionária. Os parâmetros cromatográficos que são ajustados para

se chegar à R_s alvo visam basicamente modificar a forma como os componentes de uma amostra serão distribuídos entre as duas fases. Apesar disso, o fator que atualmente tem mais impacto na qualidade de uma análise cromatográfica, além da habilidade do analista, é o tipo de fase estacionária utilizada (BORGES; EUERBY, 2013; KAHSAY et al., 2014). Segundo Niessen (2006) a coluna é considerada o “coração” de um sistema cromatográfico. É nela que se encontra imobilizada a fase estacionária.

As fases estacionárias mais utilizadas em CLAE são compostas de partículas de formato aproximadamente esférico, com poucos micrômetros de circunferência. Essas partículas formam o recheio de colunas empacotadas cujo suporte normalmente é de aço inox. A quantidade de massa com a qual uma coluna é empacotada determina a capacidade de amostra que esta pode receber.

O principal aumento na eficiência das separações em CLAE observado nos últimos anos se deve ao grande desenvolvimento que ocorreu na tecnologia de produção de colunas, com partículas das fases estacionárias cada vez menores e morfologicamente bem definidas, o que possibilitou também uma redução no tamanho e diâmetro das colunas (FARIA et al., 2006). Entretanto, esse desenvolvimento estava há muito limitado pela impossibilidade de redução das partículas a tamanhos menores do que 3,0 μm , pois o aumento na superfície de contato provocado pela diminuição do diâmetro reduz a permeabilidade da fase móvel levando a um aumento da pressão necessária para se bombear o solvente através da coluna.

O investimento no desenvolvimento de colunas monolíticas, cuja fase estacionária é imobilizada numa estrutura sólida, contínua e altamente porosa, com canais, oferecendo altas resoluções e alta permeabilidade pareceu ser a melhor solução (FARIA et al., 2006; IKEGAMI et al., 2008; FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009). Todavia, apesar de não apresentarem a limitação da alta pressão, a falta de estabilidade química dessas fases, a alta atividade silanofílica, falta de reprodutibilidade de produção e baixa capacidade de recepção de amostra as tornam pouco úteis em análises de rotina (FARIA et al., 2006).

Em meados da década passada começaram a surgir os primeiros equipamentos de CLAE capazes de suportar pressões ultra altas (FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009). Esses novos equipamentos foram chamados de ultra-

CLAE, (FARIA et al., 2006), mas atualmente ainda não há consenso quanto a sua nomenclatura em português.

Além de suportar as enormes pressões geradas nesses sistemas, os CLUE devem ter um volume morto reduzido, que seja compatível com o comprimento e diâmetro reduzidos das colunas modernas. Estas colunas, por oferecerem alta resistência à passagem do solvente, levam a um grande atrito entre a fase móvel e a estacionária, formando gradientes de temperatura em seu interior. Um reduzido comprimento, e principalmente diâmetro, favorecem a dissipação do calor liberado (SPAGGIARI et al., 2013).

Uma característica de qualquer processo cromatográfico é o já citado espalhamento das bandas. Esse efeito, apesar de característico da cromatografia, é o principal fator que prejudica uma separação. Enquanto o processo cromatográfico separa em bandas os analitos dos interferentes e da matriz, o espalhamento diminui o efeito da separação, e em casos extremos pode resultar no desaparecimento do sinal de picos com t_R elevado devido ao total espalhamento do sinal na linha de base (SNYDER; KIRKLAND, 1979). Em um equipamento de CLAE esse efeito pode ser separado em dois fenômenos independentes, o espalhamento de banda que ocorre intracoluna e o que ocorre extracoluna. O espalhamento de banda extracoluna ocorre devido ao fenômeno de difusão dos solutos no solvente, chamado de difusão longitudinal (SNYDER; KIRKLAND, 1979). Esse efeito é o espalhamento em todas as direções que ocorre quando se adiciona um soluto em um fluido. Esse fenômeno é facilmente compreensível quando se utiliza como exemplo a abertura de um frasco de perfume em uma sala grande e em pouco tempo pode-se sentir o seu odor em qualquer canto da sala. Quanto maior for o volume do solvente, maior será o espalhamento do soluto. Por isso deve-se manter menor possível o volume do sistema cromatográfico entre a injeção e a detecção para que se obtenha picos com menor espalhamento extracoluna possível. Guillarme e outros (2007) e Spaggiari e outros (2013) apontam que os sistemas CLAE contribuem com uma variância de 20 a 200 μL^2 na medida dos picos. Já os sistemas CLUE contribuem com uma variância de 4 a 9 μL^2 (FOUNTAIN et al., 2009; GRITTI et al., 2010; GRITTI; GUIOCHON, 2010; OLAH et al., 2010; FEKETE; GANZLER; FEKETE, 2011). Apesar da variância dos sistemas CLUE ser muito menor que a dos CLAE, essa contribuição representa entre 60 e 90 % da largura dos picos das análises realizadas com colunas de ultra alta eficiência seja de tecnologia core-shell, ou totalmente porosas, e essa influência

é praticamente a mesma, qualquer que seja o sistema de detecção utilizado.

O espalhamento intracoluna é um efeito mais complexo, envolvendo outros fenômenos. Destes os mais importantes são a difusão turbilhonar (A), a já comentada difusão longitudinal (B), e a cinética de transferência de massa entre as fases (C). Van Deemter e outros (1956) desenvolveram a Equação 8, que relaciona esses processos com a velocidade linear da fase móvel (\bar{u}) percolando a coluna.

Equação 8. Equação de Van Deemter.

$$h = A + B/\bar{u} + C\bar{u}$$

No espalhamento intracoluna, a contribuição da difusão longitudinal só tem relevância quando a velocidade de difusão longitudinal das moléculas é maior que a velocidade do solvente arrastando as moléculas por convecção através das partículas da fase estacionária. Pode-se observar essa relação pela Equação 8, onde o termo B é dividido por \bar{u} . Quanto maior \bar{u} , menor a contribuição de B para h. Já com o termo C, da mesma equação a relação é inversa, ao se aumentar \bar{u} , C se torna mais importante para o aumento h.

O termo A representa a difusão das moléculas devido as alterações no fluxo laminar da coluna que ocorrem na rede de canais formados pelo espaço interparticular e pelos poros dessas partículas (GIDDINGS, 1959). O termo C da equação representa a resistência na transferência de moléculas entre as fases.

Portanto, a equação de Van Deemter descreve uma hipérbole, onde $h = f(\bar{u})$. No ponto mínimo se obtém a velocidade linear do solvente para qual a eficiência da coluna é máxima.

A velocidade linear da fase móvel dentro da coluna é função tanto do fluxo do cromatógrafo, quanto da dimensão interna das colunas. As colunas de ultra alta eficiência tem a capacidade de operar com um fluxo ótimo muito menor do que as colunas convencionais, mantendo o mesmo \bar{u} , ou mesmo maior (MALDANER; JARDIM, 2009).

Van Deemter e outros (1956) assumem que os parâmetros A, B e C são fixos para uma determinada coluna, a uma determinada temperatura.

Atualmente sabe-se que os parâmetros A, B, e C da equação de van Deemter são dependentes do fluxo, e que outros fatores atuam no alargamento dos picos, como o efeito do gradiente de temperatura formado nas colunas modernas que

trabalham a altíssimas pressões. Apesar disso, através de sua equação, conseguiu-se associar o conceito até então totalmente empírico de altura equivalente a um prato teórico a um modelo matemático. Essa união mostrou a relação estreita que existe entre alargamento de banda e eficiência de separação, e conseqüentemente eficiência de uma coluna. Isso direcionou o desenvolvimento das novas colunas não só na diminuição do tamanho das partículas visando o aumento na superfície de contato, mas também na diminuição do efeito que a morfologia da fase estacionária das colunas tem sobre o alargamento das bandas.

2.3.5 Efeito das altas pressões na separação

Na década de noventa vários trabalhos mostraram o efeito da pressão sob moléculas neutras (STADALIUS; SNYDER, 1984; MCGUFFIN; CHEN, 1993; MCGUFFIN; CHEN, 1997; EVANS; DAVIS, 1999). Observa-se que o aumento na pressão do sistema promove um aumento na retenção (D_m), e a medida que se aumenta a massa molecular dos analitos, esse efeito se torna mais pronunciado, chegando a 3 vezes para proteínas (CHEN et al., 2000; OHMACHT; BOROS, 2000; PONTON et al., 2000; FELINGER; BOROS; OHMACHT, 2002; LIU et al., 2003; GRITTI; GUIOCHON, 2009). Isso mostra a maior eficiência dos CLUE, não somente por utilizarem colunas empacotadas com partículas mais compactas, mas também devido ao efeito da pressão na retenção. Esse efeito varia em função da porcentagem de água utilizada na fase móvel para colunas de fase reversa (RP), sendo que os maiores aumentos na retenção foram observados com proporções de água entre 70 e 80 % (FALLAS et al., 2010).

Segundo os autores acima, esse efeito se deve à redução do volume da camada de solvatação das moléculas em altas pressões, favorecendo a penetração dos solutos na rede hidrofóbica das partículas das RP. Durante o processo cromatográfico as partículas de fase estacionária ficam rodeadas de uma fina camada estática de solvente cuja composição é igual à da fase móvel. A retenção de um soluto ocorre quando este se transfere do filme para a fase estacionária. Quando dissolvido na fase estacionária o soluto não se movimenta pela coluna, logo, a facilitação dessa transferência aumenta a retenção, e é o que define o termo C da equação de van Deemter. Em colunas RP o efeito é maior nas moléculas em estado ionizado, provavelmente pelo fato da camada de solvatação ser maior em espécies

carregadas. Esse fenômeno é de significativa importância quando se trabalha com cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM) onde a fase móvel deve facilitar ao máximo a ionização dos analitos.

Já em colunas polares, do tipo (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) HILIC, que são utilizadas para separação de pequenas moléculas polares com alta capacidade de ionização (LINDEN; LAWHEAD, 1975; PALMER, 1975; ALPERT, 2011) o efeito observado é o inverso, há uma redução de D_m . Os dados são condizentes com a explicação do mecanismo desse fenômeno, pois em colunas HILIC, ao contrário do que ocorre nas RP, uma maior camada de solvatação favorece a permanência dos solutos na fase estacionária (IKEGAMI et al., 2008).

2.3.6 Tipos de colunas utilizadas atualmente: colunas de partículas totalmente porosas e colunas com partículas do tipo núcleo/casca ou core-shell.

Com o desenvolvimento dos equipamentos de CLUE, a utilização de colunas monolíticas ficou de lado. As separações de alto desempenho atualmente são feitas em dois tipos de colunas. As colunas empacotadas com partículas totalmente porosas, que seriam as colunas tradicionais, mas com partículas de tamanho menor que 2 μm (sub 2 μm), e as colunas empacotadas com partículas do tipo core-shell, que surgiram em 2009 (FEKETE; OLAH; FEKETE, 2012).

As colunas sub 2 μm foram disponibilizadas comercialmente em 2004, quando a Waters lançou o UPLC, primeiro CLUE comercial, mas há muito já se sabia que reduzindo-se o tamanho das partículas aumentava-se a eficiência, a velocidade linear e a transferência de massa de uma coluna (MARTIN; EON; GUIOCHON, 1974; GIDDINGS, 1965; POPPE, 1997). Entretanto, partículas de granulometria muito finas, induzem um grande aumento na pressão necessária para se bombear o solvente através delas. A resistência ao fluxo gerada pela partícula é inversamente proporcional ao quadrado do seu diâmetro (FEKETE; OLAH; FEKETE, 2012). Portanto, as tecnologias CLUE e partículas sub 2 μm tiveram de ser lançadas juntas, pois a resistência criada por esse tipo de partícula exige pressões acima de 5000 psi para se operar no fluxo ótimo de uma coluna.

O conceito de partículas revestidas com uma fina camada superficial porosa surgiu no final da década de 1960, introduzida por Horvath e outros (1967). O diferencial das partículas core-shell é a sua construção separada em duas esferas

concêntricas. O núcleo sólido (“core”) é impermeável tanto ao solvente da fase móvel quanto aos solutos, já a fina casca externa (“shell”), porosa, que recobre o núcleo é onde se dá a interação dos analitos, interferentes e matriz com a fase estacionária. Em geral nas partículas core-shell a porção porosa representa apenas uma pequena fração total do diâmetro, 0,5 μm ou menos Figura 6.

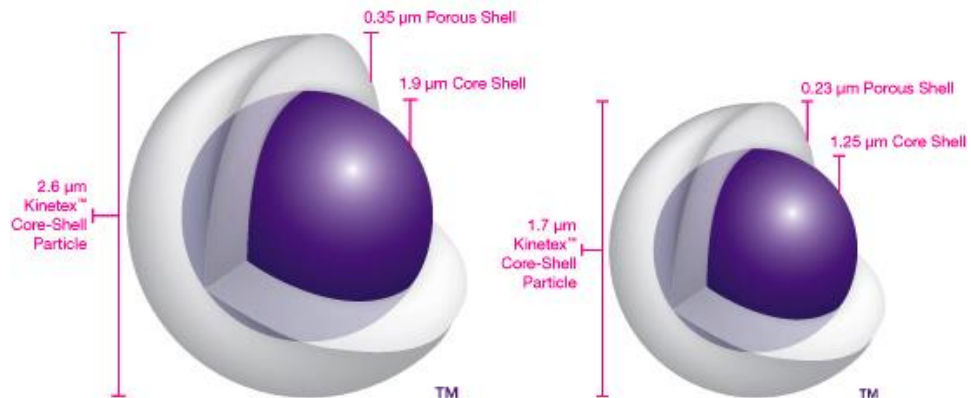


Figura 6. Estrutura das partículas do tipo core-shell. Fonte: Chromservis (2013).

Para um mesmo tamanho de partícula a altura equivalente de prato teórico das colunas core-shell é menor que das colunas com partículas porosas (FEKETE; OLAH; FEKETE, 2012). Colunas core-shell de 2,7 μm tem h equivalente a colunas de partículas porosas de 1,7 μm , enquanto colunas com partículas tradicionais porosas de mais de três micrômetros possuem valores de h bem maiores. Além da altura equivalente de prato teórico, as características de operação também são diferentes.

Os parâmetros da equação de van Deemter para as duas partículas também são diferentes. Nas colunas empacotadas com partículas core-shell o valor de B é menor, e a medida que a razão núcleo maciço/ tamanho total da partícula aumenta, menor é o valor de B, proporcionalmente. Isso pode ser explicado pelo fato de o núcleo maciço reduzir a difusão das moléculas (de solvente e soluto) pelo espaço ocupado pela própria partícula (GRITTI; GUIOCHON, 2012). Essas colunas também possuem desempenho bastante superior em relação à difusão turbilhonar. A contribuição do termo A para o espalhamento das bandas chega a ser 40 % menor nas colunas core-shell (GRITTI et al., 2010 e FEKETE; OLAH; FEKETE, 2012).

Para a resistência à transferência de massa a maior influência vem da espessura da camada porosa externa e do tamanho dos poros. Apesar disso, para

partículas de mesmo tamanho as colunas core-shell também apresentam valores menores para C (FEKETE; OLAH; FEKETE, 2012). Já se a comparação for feita entre colunas core-shell de 2,7 μm e colunas sub 2 μm totalmente porosas, o valor de C pode chegar a ser três vezes maior nas colunas core-shell (FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009). Nesses casos, valores menores de A e B das partículas core-shell acabam compensando um C mais elevado e resulta num h muito próximo para ambas partículas.

A homogeneidade no tamanho das partículas é um fator que ainda não se sabe exatamente o impacto que tem em h. Muitos autores, e fabricantes de colunas afirmam que uma maior homogeneidade contribui para uma diminuição de h (FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009; GRITTI et al., 2010). Trabalhos de Fekete e outros (2009 e 2012) mostram a influência negativa que uma superfície irregular em partículas core-shell tem em C.

Mesmo considerando os fatores citados acima que influenciam negativamente a redução de h, Fekete e outros (2012), tem relatado que em colunas de 2,1 mm esperava-se uma redução maior de h do que a que houve proporcionalmente em colunas de 3,0 ou 4,6 mm de diâmetro interno. Segundo os mesmos autores aparentemente isso se deve à falta de homogeneidade radial dessas colunas, cujo enchimento se torna mais complicado a medida que se reduz o tamanho das partículas e do diâmetro interno.

2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas pode ser definida como sendo “o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização pela massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas, empregando o espectrômetro de massas” (VESSECHI et al., 2011). Silverstein, Webster e Kiemle (2005) conceituam-na como uma técnica em que um ou mais compostos são ionizados, os íons são separados com base na razão massa/ carga e o número de íons correspondente a cada unidade de massa/ carga é registrado na forma de um espectro.

Estas características fazem da espectrometria de massas uma das técnicas analíticas mais seletivas, pois uma determinada substância pode produzir um íon único, capaz de caracterizá-la, quando se trata de equipamentos com alta resolução

e massa exata, ou um conjunto de íons fragmento, que juntamente com o íon precursor caracteriza a molécula original, sendo esta última uma possibilidade de identificação também quando se utiliza equipamentos de baixa resolução.

A obtenção do espectro de massas depende de basicamente de três etapas. A formação dos íons, a separação destes e a sua detecção/ quantificação (KOPPENAL et al., 2005). Estas etapas são executadas respectivamente pelos seguintes componentes do espectrômetro de massas, descritos abaixo: 1) fonte de íons, 2) analisador e 3) detector. A Figura 7 mostra a estrutura de um espectrômetro de massas do tipo setor magnético.

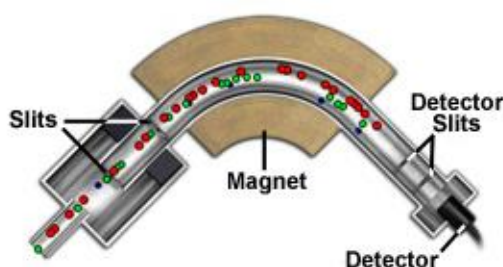


Figura 7. Espectrômetro de massas do tipo setor magnético. Fonte: Magnet Lab (2013).

Como o espectrômetro de massas só opera com íons em fase gasosa, no caso de substâncias em estado líquido ou sólido, a fonte de íons exerce ainda a função de volatilizador (desorção/ desolvatação). A configuração do equipamento a ser utilizado em uma determinada análise depende da natureza da amostra que se pretende trabalhar e que tipo de informação se deseja obter dela. O tipo de fonte utilizada determina o tipo de amostra que poderá ser trabalhada, já o grau de seletividade e a sensibilidade que se pretende obter no espectro, determinados pelo conjunto analisador/ detector utilizados.

1) Fonte de íons. As fontes de íons podem ser classificadas de acordo com suas características de operação e a forma de obtenção de íons em fase gasosa. As mais utilizadas atualmente podem ser classificadas como fontes de ionização em fase gasosa, como a ionização por, ou impacto de, elétrons (EI) e a ionização química (CI), cuja maior aplicação é na interface CG-EM; fontes de ionização por

campo (FI); fonte de desorção por laser, como as fontes de desorção/ ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI), amplamente utilizada no campo da proteômica; e fontes de ionização à pressão atmosférica (API), que são praticamente unânimes como interface dos CLAE-EM.

Funcionamento resumido destas fontes:

A fonte EI submete a amostra em fase gasosa a um feixe de elétrons com energia de 70eV, em geral. Essa energia é suficientemente grande para “arrancar” um elétron de uma molécula, formando um íon positivo M^{+} de alta energia. Esse íon, chamado molecular, se fragmenta rapidamente na fonte devido à sua alta energia. Já a CI é utilizada quando não se deseja uma fragmentação tão extensa quanto a que se obtém utilizando-se EI. Na CI um gás reagente é ionizado por EI, e este é utilizado para ionizar a amostra, também em fase gasosa. Nesse caso existe a possibilidade de diversas reações íon-molécula ocorrerem, mas geralmente pode-se observar a espécie $[M + H]^+$, que normalmente é o objetivo da utilização dessa fonte. No FI a amostra é depositada sobre um eletrodo, normalmente um filamento, onde é aplicado um campo elétrico. Uma corrente elétrica aquece o filamento e a medida que aumenta a amostra vai sendo vaporizada e ionizada. No MALDI, a ionização e a desorção são realizadas por um laser. Uma matriz contendo uma substância cromófora ao laser tem de ser adicionada a amostra. A matriz absorve a energia do laser, formando um plasma que ioniza e vaporiza os componentes da amostra.

No presente trabalho utiliza-se apenas a fonte eletrospray (ESI), tipo de fonte de API que é a mais utilizada na interface CLAE-EM, devido à sua versatilidade. As fontes de ionização em fase gasosa e FI possuem algumas limitações para servirem de interface no CLAE-EM, como a exigência da estabilidade e volatilidade térmica dos analitos, além da amostra chegar a fonte já em fase gasosa, no caso da EI e CI. Para o MALDI, a dificuldade do acoplamento está na necessidade de adição da matriz de ionização e da sua característica de funcionamento pulsado.

A fonte ESI original consiste num tubo de diâmetro interno extremamente pequeno, de aço inox, chamado capilar, por onde passa o efluente da coluna. Nesse capilar é aplicado uma diferença de potencial de alguns quilovolts em relação ao exterior, o que induz a formação de uma alta carga na superfície do líquido. A carga formada gera uma força repulsiva suficientemente alta para induzir o espalhamento

do líquido em um spray de pequenas gotículas carregadas. A saída desse capilar se abre para uma câmara por onde passa um fluxo de nitrogênio, na outra extremidade se encontra o contra eletrodo, que possui um pequeno orifício que dá acesso à uma segunda câmara, já sob vácuo (YAMASHITA; FENN, 1984). À medida que as gotas percorrem o caminho entre a ponta do capilar e a câmara seguinte, sob influência do campo elétrico formado, o solvente vai sendo evaporado, até o momento em que a enorme repulsão gerada pelos íons de carga iguais se torna maior que a tensão superficial da gota, forçando a dessorção dos íons. A diferença de potencial entre o capilar e o contra eletrodo determina a intensidade do spray formado. A Figura 8, mostra um esquema da primeira fonte ESI montada por FENN e colaboradores na Universidade de Yale.

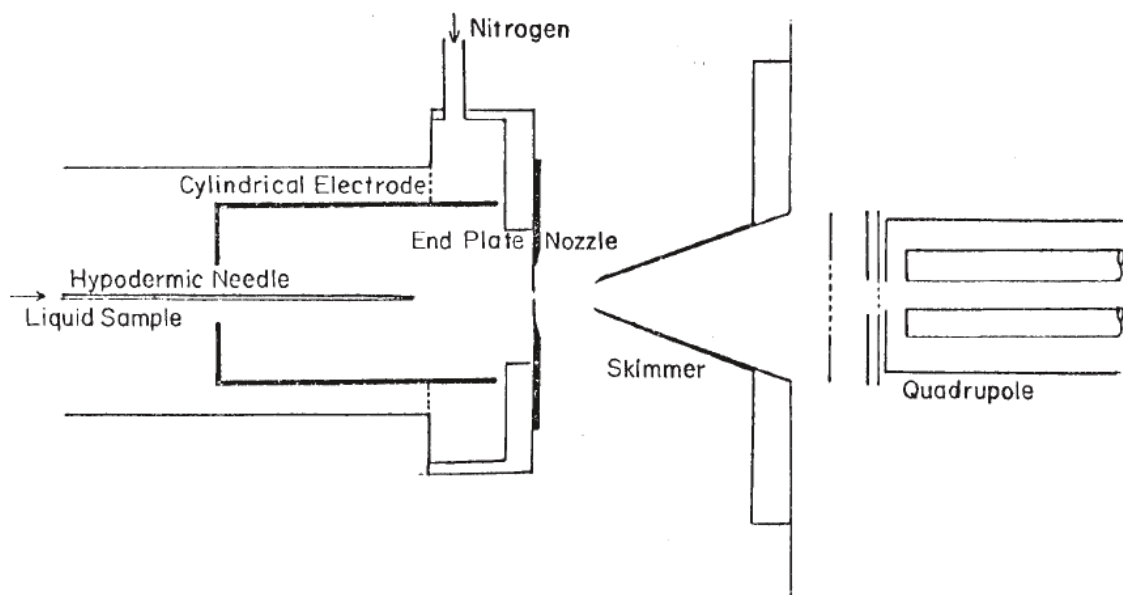


Figura 8. Esquema básico de uma fonte ESI. Fonte: Fenn (2002).

O mecanismo de funcionamento do ESI é tema de bastante controvérsia na comunidade científica (FENN; RUTAN, 2000). Entretanto, é consenso que os íons formados em solução são transferidos para a fase gasosa pela evaporação gradual do solvente neutro que participa da formação das gotículas contendo os clusters de íons. A diminuição do tamanho da gota aumenta a tensão eletrostática do cluster, devido à alta concentração de cargas de mesma polaridade, o que em um determinado momento resulta numa "explosão coulombica", formando íons individuais em fase gasosa (CROTTI et al., 2006). Esse processo não

necessariamente ocorre em apenas uma etapa, mas a medida que a gotícula tem o seu solvente evaporado, e a instabilidade das cargas na gota aumenta, se aproximando do limite de Rayleigh, jatos de líquido são formados a partir da superfície da gota, formando gotículas ainda menores. Essa, na verdade, é uma forma bastante simplificada de explicar o que ocorre em uma fonte ESI, pois sabe-se que vários outros fenômenos ocorrem simultaneamente nessas fontes, como reações iônicas em fase gasosa (NIESSEN; TINKE, 1995).

2) Analisador. O analisador é a parte do espectrômetro de massas responsável pela separação dos íons, o que efetivamente caracteriza cada espécie. Cada analisador possui características particulares, vantagens e desvantagens que impossibilita eleger apenas um analisador que seja o melhor entre eles. Pode-se separá-los em dois tipos, os de resolução unitária e os de alta resolução. A resolução em espectrometria de massas, assim como em cromatografia, é a separação entre dois picos adjacentes. O sinal gerado em uma análise de EM é um gráfico contendo os picos referentes aos sinais de m/z dos analitos com formato gaussiano. A resolução pode ser calculada dividindo-se o valor da massa nominal de um determinado m/z (M), pela diferença de m/z do pico seguinte (dM) M/dM . Por convenção um equipamento com analisador de alta resolução deve ter uma resolução de pelo menos 10000. Equipamentos com resolução unitária fornecem dados de m/z que podem ser distinguidos uns dos outros por 1 unidade de massa, ou 1 Da. Já os analisadores de alta resolução conseguem diferenciar íons, que possuem mesma massa nominal, mas com m/z de diferentes valores decimais, por isso são bem mais seletivos em seus resultados.

Os analisadores mais utilizados em bioanálises (alimentos, toxicológicas, metabólitos, etc.) são o quadrupolo (Q), a armadilha de íons, ou "TRAP", termo em Inglês, e os tempo de voo (TOF). Os quadrupolos, também conhecidos como filtros de íons, possuem altíssima sensibilidade quando operando em modo seletivo, ou seja, monitorando especificamente um ou mais íons previamente selecionados (Figura 9). Quando montados em sequência, permitem a seleção e a fragmentação dos íons, gerando os dados EM-EM. Quanto mais quadrupolos em sequência, maior a possibilidade de selecionar fragmentos do íon precursor e fragmentá-los ainda mais (ex: pentaquadrupolo). Não são muito utilizados para análises em modo de varredura, pois apresentam baixa sensibilidade operando dessa forma.

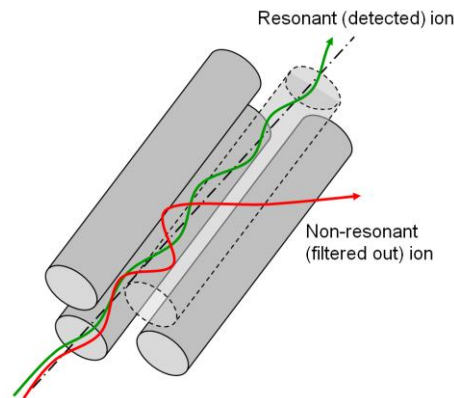


Figura 9. Esquema de um analisador do tipo quadrupolo. Fonte: MTL (2013).

A limitação desses analisadores reside na sua resolução unitária (LACORTE; FENANDEZ-ALBA, 2006). Quando há coeluição, ou interferentes próximos ao pico de interesse, a seletividade e a quantificação podem ficar comprometidos. Em certos casos os sinais de interferentes podem ser confundidos com sinais de "carry over", ou do próprio analito.

Os TOFs são analisadores que fornecem dados em alta resolução, e diferentemente dos Q não operam com varredura, e por esta razão apresentam maior sensibilidade que os Q quando a análise visa a detecção total dos íons de uma amostra (NIESSEN, 1999). Dessa forma, possuem um poder muito maior de identificação, além de oferecerem mais informações sobre a amostra analisada.

A separação das massas em um TOF se baseia nas diferentes velocidades obtidas por corpos (íons) com diferentes valores de m/z após terem sido acelerados por um mesmo impulso (Figura 10).

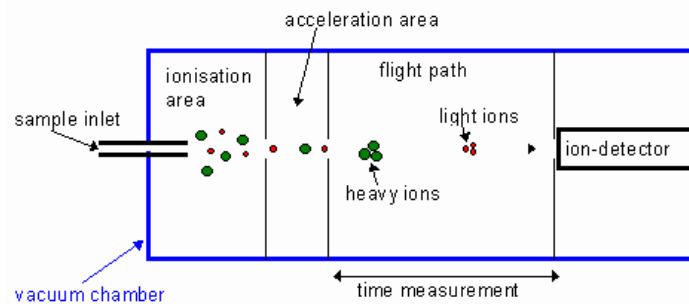


Figura 10. Esquema de funcionamento de um analisador do tipo TOF. Fonte: Kore Technology (2013).

Atualmente, a maioria dos TOFs operam com massa exata (quando se utiliza a correção de massa com "lockmass"), que é a capacidade de fornecer dados de m/z muito próximos ao valor real do analito, possibilitando a dedução de sua fórmula molecular. Apesar disso, os triplo quadrupolos (QqQ), operando em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) ainda possuem sensibilidade superior. As outras desvantagens desses analisadores são o custo muito mais elevado tanto para aquisição quanto para manutenção, a necessidade de calibração diária, a sensibilidade desta em relação à temperatura ambiente e estabilidade da rede elétrica, e o tamanho do equipamento, que é diretamente proporcional ao tamanho do tubo óptico (o analisador propriamente dito). A faixa linear de trabalho desses analisadores também é bem menor que a dos Q, dificultando trabalhos com quantificação.

Já os TRAPs se apresentam de vários tipos: os convencionais "Ion Traps", os Traps lineares (QTrap), Orbitraps e ressonância ciclotrônica de íons (ICR). Os TRAPs convencionais são baseados na "armadilha de íons de Paul" e são cada vez menos utilizados devido à perda de informações de fragmentos com m/z de até 25% do m/z do íon precursor. Assim como os Q possuem resolução unitária. Os TRAPs mais modernos (QTrap e Orbitrap) contornaram esse problema e estão popularizando os TRAPs novamente no mercado. Em equipamentos do tipo QqQ, a tendência é que o terceiro quadrupolo seja substituído por um QTrap, pois este adiciona ao equipamento a capacidade de realizar EM^n (inúmeras fragmentações) e aumenta a sensibilidade, devido a sua capacidade de acumular íons (Figura 11), também operam com resolução unitária.

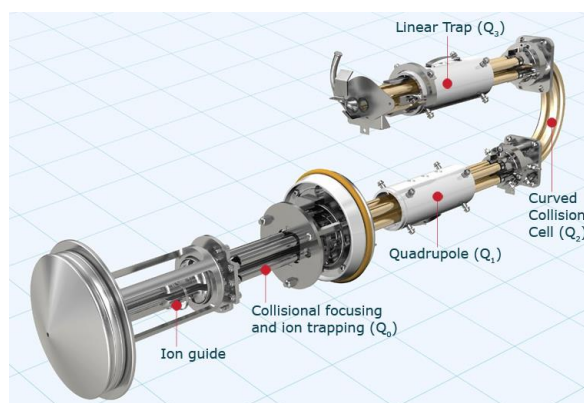


Figura 11. Esquema de um analisador QTrap. Fonte: Chromacademy (2013).

Os QTraps aprisionam os íons na forma de movimento linear dentro do quadrupolo. De uma maneira geral esses analisadores são visualmente muito parecidos com qualquer QqQ, sendo que a diferença é na operação do último quadrupolo (Q3) que consegue aprisionar linearmente os íons.

Já os Orbitraps são baseados na “armadilha de íons de Kingdom” e além das características dos QTraps, possuem alta resolução, oferecendo resultados com 4 casas decimais, e podem ser uma tendência de substituição dos TOFs devido à sua simplicidade e menor custo. Os Orbitraps funcionam de maneira diferente dos QTraps. Nos Orbitraps os íons são acelerados para dentro do analisador, um espaço entre dois fusos. No fuso central é aplicado um campo eletrostático que induz a ressonância dos íons ao seu redor, a frequência e amplitude do movimento são característicos de cada m/z . Abaixo pode-se observar o esquema de um Orbitrap (Figura 12).

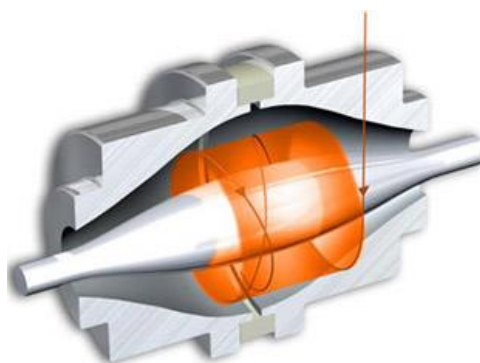


Figura 12. Esquema de um Orbitrap. Fonte: Thermoscientific (2013).

Em CLAE-EM com analisador do tipo Q, a utilização de analisadores sequenciais (CLAE-EM/EM) se tornou praticamente mandatório para se obter resultados confiáveis (CE, 2002). Com os analisadores trabalhando em conjunto pode-se executar os 4 modos básicos de operação de análise de massas quando combinadas com a dissociação induzida por colisão (CID) (VESSECCHI et al., 2011). Essas operações são: varredura de íons produto, varredura de íons precursores, perda neutra e monitoramento de íon selecionado (SIM) (BOCXLAER et al., 2000).

Já os equipamentos híbridos possuem dois analisadores de tipos diferentes acoplados, e estão se tornando importantes quando utilizados juntamente com TOFs. Quando se utiliza um Q acoplado a um TOF (QTOF) associa-se a alta

seletividade do Q em modo SIM à alta resolução do TOF, aumentando-se a confiabilidade do resultado (GRIMALT et al., 2010).

3) Detectores. Segundo Koppenaal e outros (2005) “os detectores são os olhos de um espectrômetro de massas”. O Detector que acompanha um analisador e uma fonte, para compor um determinado tipo de equipamento é escolhido de acordo com as suas características de funcionamento. Um quadrupolo, por exemplo, funciona muito bem com um detector capaz de monitorar íons isolados. Já um TOF necessita um detector capaz de monitorar íons isolados, mas com leitura e recuperação extremamente rápidos para que possa captar uma grande quantidade de íons chegando num intervalo de tempo muito pequeno, compatível com as análises em varredura. Detectores em equipamentos que trabalham medindo razão isotópica precisam fornecer um sinal altamente estável, para que seja possível medir a razão entre os isótopos da maneira mais precisa possível.

A maioria dos detectores usados em EM hoje em dia é baseada em multiplicação de elétrons secundários (SEM). Esses detectores são construídos com base em arranjos de dinodos, sendo que o primeiro é sensível à íons. Essas espécies colidindo no primeiro dinodo promovem a emissão de elétrons secundários que vão colidindo com os dinodos sequenciais promovendo uma reação em cadeia que amplifica o primeiro sinal gerado na colisão do íon.

Detectores com esse tipo de construção são capazes de amplificar o sinal de íons isolados, trabalhando de forma pulsada, sendo ótimos para análises que necessitem de alta sensibilidade, contudo, quando a contagem de íons é muito alta ($> 10^6$ cps), principalmente quando se trabalha com amostras mais concentradas, o detector começa a sobrepor os sinais dos íons perdendo sua característica pulsada e conseqüentemente sua resposta linear para quantificação (KOPPENAAAL et al., 2005). Os SEM atualmente utilizados constituem num único tubo, revestido internamente com um material capaz de atuar como dinodo (Figura 13). Estes tubos são chamados de multiplicadora de elétrons de dinodo contínuo (CDEM).

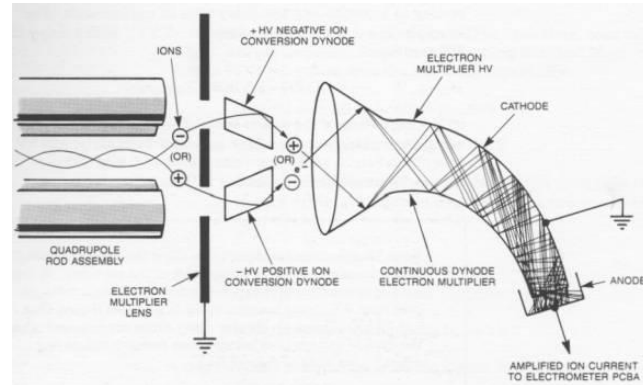


Figura 13. Esquema de funcionamento de um detector CDEM. Fonte: Labexchange (2013).

A placa de multicanais (MCP) é uma variação do CDEM, onde uma série de microcanais, que atuam como micro CDEMs, são dispostos numa placa ou disco, cuja superfície emissora é ionicamente sensível (Figura 14). Em todos esses casos a nuvem de elétrons gerada pela amplificação é direcionada para um anodo que faz a detecção.

O MCP, devido ao tamanho reduzido dos microcanais, faz com que o sinal gerado por cada colisão de um íon com a superfície do detector produza pulsos extremamente rápidos, com aproximadamente 1 ns, o que os torna os detectores de escolha para utilização com TOFs, que necessitam de alta precisão nas medidas do tempo de voo de cada íon.

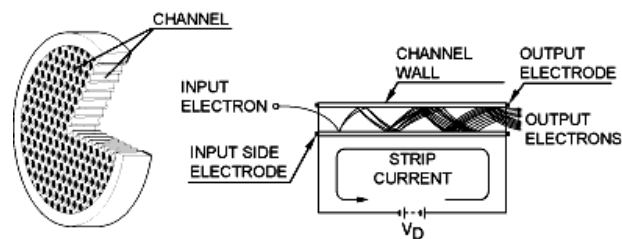


Figura 14. Esquema de um MCP. Fonte: Sciner (2013).

Existem ainda combinações destes SEMs com fotomultiplicadores acoplados a arranjos de fotodiodos. Esses dispositivos são chamados de eletro-ópticos.

Os EM que trabalham com o aprisionamento de íons, e os mantêm em movimento ressonante dentro do analisador, como os analisadores do tipo ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FTICR) e Orbitrap, conseguem fazer a detecção de uma maneira diferente, mais robusta e exata, através da indução de uma corrente em bobinas ou eletrodos posicionados junto ao analisador, pelo movimento dos íons. Cada íon, com seu m/z característico, se movimenta dentro dos analisadores destes equipamentos com frequência e amplitude específicas, essa frequência gera uma corrente no detector que pode ser medida de forma precisa, levando as altas resoluções obtidas facilmente por esse tipo de equipamento (Figura 15).

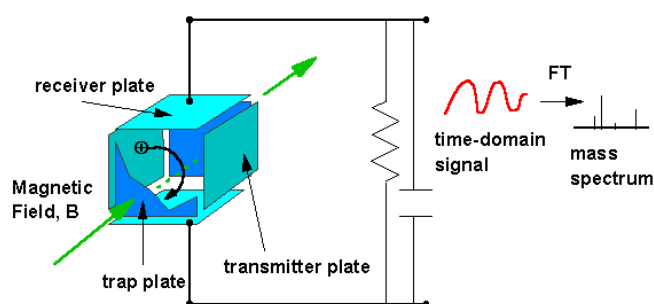


Figura 15. Esquema de um analisador FTICR com seu detector em forma de eletrodos. Fonte: Vries Group (2013).

2.5 ACOPLAMENTO CLAE-EM, A INTERFACE

Niessen e Tinke (1995) afirmam em seu trabalho, publicado há quase 20 anos, que o CLAE-EM já era bastante utilizado. Apesar disso, os esforços que levaram à obtenção da interface que popularizou a técnica remetem há mais de 35 anos (BOWERS, 1989).

São três os principais problemas a serem contornados para que se possa obter uma interface CLAE-EM eficiente: adequação ao sistema de vácuo do alto fluxo de solvente, por volta de 1,0 mL/min, a eliminação de solventes e aditivos não voláteis presentes na fase móvel, e ionização e volatilização de analitos não voláteis e/ou termolábeis.

As técnicas de ionização disponíveis na época eram as utilizadas no CG-EM, que não servem para o CLAE-EM, como o EI e a CI, que exigem que o analito esteja

em fase gasosa. A solução encontrada seria vaporizar todo o efluente do cromatógrafo fazendo-o se expandir em uma câmara aquecida. Contudo, a simples vaporização do solvente para em seguida inserí-lo no analisador quebraria o alto vácuo. Um fluxo de 1,0 mL/min de solvente sendo vaporizado gera mais de 1,0 L/min de gás. Para não se quebrar o vácuo do analisador apenas 0,01% do efluente da coluna, com esse fluxo, à pressão atmosférica, poderia adentrar a região do analisador. A fonte desenvolvida deveria ter um sistema de amostragem que permitisse apenas 0,01 μ L/min entrar na região do analisador. A utilização de uma válvula de separação de fluxo (“split”) ao final da coluna não resolveria o problema, pois ela eliminaria, além do solvente, parte dos analitos, diminuindo a sensibilidade do sistema. A forma encontrada para resolver o problema foi acrescentando estágios adicionais de bombeamento de vácuo (aumentando gradativamente o vácuo) antes da amostra chegar à região do analisador, levando à evaporação gradativa do solvente, sem quebrar o alto vácuo do analisador. A câmara de expansão/vaporização do efluente do cromatógrafo a pressão é próxima à atmosférica e se situa antes da região de vácuo diferencial. Um cone de amostragem (“skimmer”) faz a captação de parte do líquido vaporizado e o transfere para a região de vácuo diferencial já num fluxo extremamente reduzido em relação àquele da saída do CLAE, permitindo às bombas de vácuo maior eficiência na eliminação restante de solvente. O resultado final é o que se conhece hoje como fontes API, como o ESI de John Fenn mostrado na Figura 8.

As fontes API se diferenciam entre si na etapa de ionização (NIESSEN, 1999). O ESI ioniza as moléculas antes da sua volatilização. Na fonte desenvolvida por Fenn e colaboradores, a ionização se dá em solução, dentro de um capilar de aço onde é aplicada uma voltagem de alguns milhares de volts. Já na fonte de APCI, não existe capilar. O efluente da coluna é vaporizado dentro de um tubo aquecido antes de chegar à câmara de expansão, quando então o gás encontra uma agulha, chamada corona, onde é aplicada uma alta voltagem. Esse efeito promove uma descarga elétrica nas moléculas volatizadas, ionizando-as, e iniciando assim uma série de reações de íons em fase gasosa. O restante do processo é igual para ambas fontes API.

Segundo Niessen e Tinke (1995) a aplicação de uma diferença de potencial na região de vácuo intermediário (após o cone de extração) induz a “fragmentação” na fonte do íon precursor, e foi muito útil antes do desenvolvimento dos quadrupolos

de fragmentação, como os utilizados nos QqQ, para obtenção de informações estruturais através da fragmentação.

Na fonte ESI a aplicação da diferença de potencial no capilar para induzir a ionização também induz a formação de um “spray” na saída do capilar. Entretanto, nas fontes atuais existe uma combinação desse efeito com a nebulização induzida por nitrogênio gasoso aplicado na extremidade do capilar, na mesma direção da saída destes, aumentando a eficiência da volatilização dos analitos, melhorando a sensibilidade geral do equipamento. O cone de amostragem, possuindo carga contrária à do capilar e dos analitos, é colocado perpendicularmente à saída do capilar, atraindo os íons e evitando a entrada de solvente, que em sua maior parte permanece neutro, melhorando a eficiência da eliminação do solvente e aditivos e eliminando interferentes.

A utilização contra corrente de um fluxo de nitrogênio aquecido acelera a secagem das gotas, aumentando a sensibilidade. Esse fluxo normalmente é colocado junto ao cone de amostragem de forma que a expulsão dos íons dos clusters ocorra em sua maior parte após a amostragem.

2.6 ANÁLISE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

2.6.1 Análise de aflatoxinas em amendoim

As aflatoxinas são contaminantes que podem ser encontrados em diversos produtos agrícolas, principalmente amendoim e milho (BARRABIN, 2012). São substâncias naturalmente produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e estão entre os carcinogênicos naturais mais potentes (FDA, 2012).

No Brasil sua análise se dá através de CCD e CLAE com derivatização e detecção por UV ou fluorescência, técnicas atualmente não mais aceitas pela Comunidade Europeia para análise destes contaminantes, tendo em vista a baixa seletividade (CE, 2002).

Pode-se observar na Tabela 1 alguns métodos utilizados para análise de aflatoxinas.

Tabela 1. Alguns métodos utilizados para análise de aflatoxinas.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
LI; ZHANG; ZHANG, 2009	ACN agitação	Cromatografia de imunoafinidade	ELISA, RIA	7 min	Acetato de amônio, ácido fórmico e MeOH
WALTKING; WILSON, 2006	água e MeOH	Cromatografia de imunoafinidade	CLAE com derivatização	-	ACN, MeOH, água
ARZANDEH'; SELAMAT; LIOE, 2010	água e MeOH	Cromatografia de imunoafinidade	CLAE com derivatização	20 min	ACN, MeOH, água
VOSOUGH; BAYAT; SALEMI, 2010	água, MeOH e hexano	SPE	CLAE	13 min	ACN, MeOH, água
SHEIBANI; GHAZIASKAR, 2009	sob pressão com fluido supercrítico	-	CCD	-	benzeno, ACN, clorofórmio, acetona

A maior parte dos métodos utiliza uma extração relativamente simples, com solvente orgânico e água. Alguns métodos utilizam hexano (VOSOUGH; BAYAT; SALEMI, 2010) para eliminação dos lipídeos, muito abundantes em alguns cereais como o amendoim e o pistache. Os lipídeos de uma amostra podem agir como interferentes na análise. Em seguida à extração existe alguma etapa de purificação com concentração, quase sempre por cromatografia de imunoafinidade, como nos métodos de Walting e Wilson, (2006) e de Vosough, Bayat e Salemi, (2010), ou extração em fase sólida (SPE). Em ambos os casos nessa etapa é que se realiza a parte mais importante da purificação, que viabiliza a etapa seguinte da análise onde é feito o isolamento e identificação do analito. Essa última fase pode ser feita por CLAE com derivatização fotoquímica e detecção fluorimétrica, o que não atende aos requisitos da CE (2002). Alguns métodos recentes, como os de Li, Zhang e Zhang (2009) e Heibani e Ghaziaskar (2009) utilizam métodos ainda menos seletivos e exatos como CCD, “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e radioimunoensaio (RIA). Li, Zhang e Zhang (2009) advogam a favor da utilização das técnicas de imunoensaio (ELISA e RIA) por estas possibilitarem a análise de uma grande quantidade de amostras de uma só vez e de serem relativamente baratos. Afirmam também que os métodos que utilizam técnicas de imunoensaio são

úteis particularmente para o “terceiro mundo”, pois apesar da menor seletividade e exatidão em comparação com técnicas como CLAE, CLAE-EM e CLAE-EM/EM são mais baratos, e exigem menor aptidão para na utilização.

Beltrán e outros (2011) utilizaram CLUE-EM/EM para quantificar micotoxinas em leite, técnica em conformidade com a legislação europeia atual. Mesmo assim, afirmam que a seleção dos íons produto para caracterização foi muito cuidadosa para evitar falso positivos. Seu método é bem mais rápido quando comparado com os outros. Obteve limites de quantificação bem abaixo do exigido pela Comunidade Européia (CE, 1996) que é de 2 µg/kg.

O método de Vosough, Bayat e Salemi (2010) que demora 13 minutos sem considerar a etapa de preparo da amostra também tem um tempo razoável de análise, mas a técnica utilizada não faz detecção por EM.

2.6.2 Análise de cloranfenicol em mel

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro de ação, altamente eficaz e de baixo custo (RIBEIRO DA SILVA, 2009). Nos seres humanos pode causar anemia aplástica e existem algumas preocupações relacionadas com a potencial carcinogenicidade e genotoxicidade deste fármaco. Por essa característica o cloranfenicol é proibido no Brasil e em diversos outros países e a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda a sua utilização em animais que servirão de alguma forma para alimentação humana (WHO, 2004; BRASIL, 2003; FDA, 1997; CE, 1998).

Os métodos atualmente utilizados para se analisar cloranfenicol em alimentos são baseados em cromatografia ou técnicas de eletroforese. A Tabela 2 mostra alguns dos métodos recentes que podem ser encontrados na literatura.

Tabela 2. Alguns métodos utilizados para análise de cloranfenicol em alimentos.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
DA SILVA; SILVA; DRUZIAN, 2010	ELL	SPE	CG derivatização	20 min	-
PEZZA et al., 2006	ELL	-	EC	47 min	tampões diversos
JÚNIOR et al., 2006	ELL	-	CLAE-EM/EM	14,5 min	Acetato de amônio, MeOH
LI et al., 2013	ELL	-	CLAE	6,5 min	MeOH, água
KAUFMANN et al., 2007	-	-	CLUE-TOF	9 min	ACN, água e ácido fórmico

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, desde CLAE à CG com derivatização. O preparo de amostra normalmente é simples, com uma extração líquido-líquido e em alguns trabalhos utiliza-se purificação por SPE. Da Silva, Silva e Druzian (2010) utilizaram CG com detecção por captura de elétrons, mas precisaram derivatizar o analito para viabilizar a sua volatilização. Já Pezza e outros (2006) fazem uma análise por eletroforese capilar (EC), que tem a vantagem de não utilizar solventes orgânicos e um volume bem reduzido de tampões. Entretanto sua análise é bastante demorada. Li e outros (2013) utilizaram CLAE com detecção por UV. Seu método é um dos mais rápidos encontrados na literatura, com 6,5 minutos, contudo, dos métodos apresentados acima, apenas o método de Júnior e outros (2006) e de Kaufmann e outros (2007) atendem aos requisitos da CE (2002) que exige a utilização de técnica que forneça informação estrutural do analito para servir como confirmatória. Júnior e outros (2006) utilizam CLAE com detecção por EM/EM por QqQ e Kaufmann e outros (2007) utilizaram CLUE-TOF. O método de Kaufmann e outros (2007), apesar de utilizar CLUE é mais demorado que o de Li e outros (2013), que utiliza apenas CLAE.

2.6.3 Análise de melamina em leite

A melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) é usada para produção de resinas, adesivos e plásticos. Entretanto, é também utilizada em fraudes como fonte de nitrogênio não proteico, pois sua composição apresenta 67% de nitrogênio. Como já mencionado, o método de Kjeldahl determina somente o teor de nitrogênio total, de

modo que a sua adição ao leite pode mascarar uma outra adulteração, a adição de água.

A análise de melamina é realizada atualmente em diferentes matrizes, desde urina, para confirmar uma contaminação, à alimentos como leite e derivados, ou ração animal (CHENG et al., 2009; VAIL; JONES; SPARKMAN, 2007). Em geral essas análises são feitas por CLAE, principalmente pela característica bastante polar da melamina. Na Tabela 3, observa-se alguns métodos para análise de melamina.

Tabela 3. Alguns métodos utilizados para análise de melamina.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
TIAN et al., 2012	água, ácido acético 2h	-	CLAE	10 min	ACN, acetato de amônio
XU et al., 2010	Resina magnética	-	CLAE-EM/EM	10 min	MeOH acetato de amônio
SUN et al., 2010	ELL	SPE	CLAE	11 min	ACN, heptanosulfonato
CHENG et al., 2009	HCl 0,1M	SPE	CLUE-EM/EM	4 min	ACN, formiato amônio
SU et al., 2013	-	-	CCD-MALDI-TOF	-	nanopartícula de silício e ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinâmico

Diferentemente do que ocorre com o cloranfenicol, o SPE é bastante utilizado, e a extração é complexa e demorada. Se utiliza uma extração com solvente e água, muitas vezes a concentração do extrato é complicada, exigindo o uso de evaporador rotatório, que consome bastante tempo, ou a concentração/ purificação por SPE em colunas de troca iônica, pois a melamina praticamente não é retida em fases do tipo C18. Observa-se que existem métodos bastante rápidos, como o de Cheng e outros (2009), com apenas 4 minutos, e o de Tian e outros (2012), com 10 minutos. Entretanto, o método de Tian e outros é bastante demorado na etapa da extração, levando mais de 2 h para cada amostra. Tian também utiliza em seu trabalho um método imunoenzimático, o ELISA. Neste caso a etapa da extração foi bem mais rápida, entretanto a etapa do ELISA propriamente dita foi demorada, levando 50

minutos. Dos métodos apresentados na Tabela 3 apenas dois atendem aos requisitos de seletividade da CE (2002), o de Cheng e outros (2009) e o de Xu e outros (2010).

2.6.4 Análise de tetraciclina em leite

A tetraciclina é um antibiótico natural e encontra ampla aplicação em animais devido ao seu largo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (XU et al., 2008).

Os métodos utilizados para detecção e quantificação deste antibiótico são também baseados em sua maioria em cromatografia. Quase a totalidade dos métodos utiliza algum tipo de cromatografia líquida como se observa na Tabela 4.

Tabela 4. Alguns métodos utilizados para análise de tetraciclina em alimentos.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
XU et al., 2008	TCA	SPE	CLAE-EM/EM	13 min	metanol ácido fórmico
MEISEN et al., 2010	-	-	CCDAE MALDI-TOF	-	-
SHALABY et al., 2011	TCA ultrassom	SPE seguida de ELL	CLAE	20 min	tampão acetonitrila metanol
CHÁFER-PERICÁS et al., 2011	água, MeOH	-	CLAE-EM/EM	45 min	acetonitrila e ácido fórmico
YU et al., 2011	sob pressão com MeOH e TCA	-	CLAE	20 min	acetonitrila, metanol ácido oxálico

Observa-se que a etapa de extração destes métodos é um tanto complexa. Costuma-se utilizar ácido tricloro acético (TCA) para desnaturar as proteínas, acidificar o meio e forçar a migração da tetraciclina para a fase aquosa. Muitos métodos fazem a utilização de solução de extração com EDTA para quelar íons, que também podem atrapalhar a extração da tetraciclina, como o Ca^{2+} presente no leite e derivados, ou solução de ácido fosfórico para a desnaturação das proteínas de precipitá-las. Etapas de purificação costumam também ser necessárias dando preferência à utilização de fases monolíticas poliméricas para SPE, que não contém íons ou extração líquido-líquido (ELL). Dos métodos da Tabela 4 apenas dois

atendem aos requisitos da CE (2002) o de Xu e outros (2008) e o de CHÁFER-PERICÁS e outros (2011). O de Xu e outros é o mais rápido, com 13 minutos, mas as etapas de extração com TCA e a SPE consomem tempo e aumentam a complexidade da análise. Além disso, o TCA é reconhecidamente um indutor de supressão de ionização em fontes ES.

2.6.5 Análise de histamina em vinho

A amina biogênica mais tóxica presente em vinhos é a histamina. Esta substância tem um curto período de incubação, podendo provocar intoxicação entre minutos e algumas horas após a ingestão. Os sintomas incluem dor de cabeça, rubor facial e sudorese, erupção cutânea e prurido, náuseas, vômitos, diarreia e palpitações cardíacas (BECKER et al., 2001).

O controle do nível de histamina em alimentos é importante para evitar que os consumidores sejam expostos ao risco de intoxicação, e serve também como indicador de qualidade, tendo em vista que a histamina é produzida por algumas bactérias do gênero *Enterococcus* (SCHULZ, 2009). A Tabela 5 mostra alguns métodos atuais de análise de histamina em alimentos.

Tabela 5. Alguns métodos utilizados para análise de histamina em alimentos.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
BOURGOGNE et al., 2012	microdiálise	Acetato de etila	HILIC CLAE-EM/EM derivatização	17 min	ACN, formiato de amônio
JIA et al., 2012	HCl 0,1M	-	CLUE-TOF derivatização	21 min	ACN, ácido fórmico
PRESTES et al., 2007	-	-	CLAE derivatização	13 min	tampão, THF, trietilamina, MeOH
DANG; PESEK; MATYSKA, 2013	-	SPE para sólidos	HILIC-CLAE-TOF	10 min	ACN, propanol e ácido fórmico
BACH et al., 2012	-	-	CLAE derivatização	22 min	ACN, tampão fosfato, MeOH

A histamina, assim como a melamina, é uma amina altamente polar, sendo que a sua extração quase sempre necessita de desnaturação de proteínas e

utilização de solução aquosa, de difícil concentração. Em amostras líquidas, como o vinho, normalmente se passa diretamente para uma purificação/ concentração em SPE ou colunas de troca iônica, seguida de derivatização. A derivatização pode ser feita também “pós coluna”, ou seja, após a separação cromatográfica, antes da etapa de detecção.

Observa-se que quase a totalidade dos métodos utiliza derivatização, mesmo quando a detecção é realizada por EM. Dos métodos mostrados acima, apenas o de Dang, Pesek e Matuska (2013) não utiliza derivatização. É também o mais rápido, com 10 minutos, utilizando HILIC para separação. Dang, Pesek e Matuska, em seu trabalho pretendem mostrar que a HILIC pode ser uma ótima alternativa para análise de alimentos, e utiliza a histamina como demonstração, mas também não conseguiram deixar de utilizar a SPE no preparo das amostras.

Já Bourgogne e outros (2012), faz a análise por HILIC CLAE-EM/EM. Após a extração realizam uma derivatização com anidrido propiônico, que leva 2 h. Após a derivatização é necessária uma ELL com acetato de etila. Justificam a derivatização para melhorar a etapa cromatográfica, separando o analito dos interferentes e aumentando a massa para melhorar a detecção em sistemas EM com baixo desempenho na detecção de analitos com pequena massa molecular .

Jia e outros (2012) utilizam RP CLUE-TOF em sua análise. Apesar disso fazem uma derivatização com cloreto de dansila para diminuir a polaridade da histamina viabilizando a análise por RP. O processo de derivatização é demorado, e apesar de não exigir etapas posteriores de extração e/ou purificação leva mais de 1,5 h.

2.7 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS DE VINHO E SUCO DE UVA

Uvas e seus derivados possuem substâncias que apresentam comprovadas atividades preventivas, ou mesmo terapêuticas, como anti-inflamatória, antineoplásicas, antiaterosclerótica, entre outras (SOVAK, 2001).

Dentre essas substâncias, os compostos fenólicos são os associados à famosa atividade cardioprotetora e antioxidante (PAIXÃO et al., 2008).

De uma forma geral, os ácido orgânicos e os fenólicos também interferem nas características sensoriais destas bebidas principalmente acidez, amargor e adstringência.

Vários trabalhos tem procurado identificar esses componentes no vinho, devido a sua importância e também para caracterização da bebida. (BIASOTO et al., 2010; SAURINA, 2010; CATHARINO et al., 2006).

Na Tabela 6 se encontram alguns métodos analíticos para análise de fenólicos e outras substâncias em vinho e outras matrizes.

Tabela 6. Alguns métodos utilizados para análise de fenólicos em matrizes naturais.

Referência	Extração	Purificação	Análise	Tempo	Solvente
GÓMEZ-ROMERO et al., 2011	liofilização e MeOH		CLAE-TOF	13 min	ACN e ácido fórmico
PUÉRTOLAS et al., 2010	-	-	CLAE	100 min	ACN e ácido fórmico
CEJUDO-BASTANTE et al., 2011	SPE	-	CLAE-TRAP	-	ACN e ácido fórmico
FLAMINI et al., 2013	Maceração com N ₂ líquido e extração MeOH	-	CLUE-TOF	25 min	ACN e ácido fórmico
CARPENTIERI; MARINO; AMORESANO, 2007	-	-	MALDI-TOF	-	ACN, água ácido dihidroxibenzoico

A maior parte dos métodos encontrados na literatura para esse tipo de análise utiliza como técnica de separação a CLAE. Diferentemente dos outros métodos citados neste trabalho, quando se trata de análise de fenólicos com detecção acoplada à EM o principal equipamento utilizado é o TOF, enquanto nos outros casos se utiliza o Q, ou QqQ. O preparo de amostra costuma utilizar algum tipo de purificação, em SPE ou fracionamento, mas quase sempre não dispensa a cromatografia para separação e identificação dos analitos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Dos métodos apresentados na Tabela 6, apenas o de Puértolas e outros (2010) não utiliza uma técnica com detecção por EM. Nesse método amostras de vinho são filtradas e injetadas diretamente no cromatógrafo. A análise é extremamente demorada (1,7 h) e a detecção é realizada por UV/Vis nos seguintes comprimentos de onda: 280 nm para os flavanois, 360 nm para os flavonóis, 320 nm para o ácido cinâmico e seus derivados e 520 nm para as antocianinas. Nota-se a baixa seletividade na detecção, sendo a diferenciação entre substâncias da

mesma classe pelo t_R . Puértolas e outros (2010) ressaltam ainda a dificuldade de se obter padrões para todos os analitos avaliados e afirmam que em muitos casos a identificação de substâncias de uma mesma classe por t_R sem o auxílio de padrões foi feita inferindo-se a ordem de eluição e comparando com dados da literatura.

Cejudo-Bastante e outros (2011) apesar de terem utilizado a detecção por TRAP, realizaram a quantificação de fenólicos em vinho por UV/VIS acoplado um detector de arranjo de fotodiodos na saída da coluna, antes do EM. A quantificação foi feita nos mesmos moldes e com os mesmos comprimentos do método de Puértolas e outros e ressaltaram as mesmas dificuldades em se obter os padrões.

Gómez-Romero e outros (2011) analisaram os fenólicos de vegetais liofilizados por CLAE-TOF. A extração se deu com MeOH em banho de ultrassom, seguida de centrifugação. Novamente a identificação da maioria das substâncias só foi possível pela comparação do espectro de massas com dados da literatura, uma vez que não havia padrão disponível.

Flamini e outros (2013) trabalharam apenas com a detecção de estilbenos em amostras de uva. As uvas foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida os estilbenos foram extraídos com metanol. O extrato foi analisado por CLUE-TOF em uma análise demorada para o equipamento empregado. O objetivo de Flamini e outros era comparar os dados obtidos com o de bancos de dados, uma vez que havia também a indisponibilidade de padrões para a maior parte dos analitos. Ele cita ainda que os bancos de dados não contém informações específicas para muitas matrizes complexas e que a identificação foi feita então pelos dados de EM obtidos como massa exata e dados de fragmentação.

Carpentieri, Marino e Amoresano (2007) desenvolveram um método de análise de fenólicos de vinho por MALDI-TOF sem a necessidade de extração ou preparo de amostra. O método é rápido e eficiente, entretanto, a técnica de MALDI não é tão eficiente para análise de substâncias de baixo peso molecular e também não é capaz de diferenciar isômeros que se fragmentam da mesma maneira. Os próprios autores sugerem o uso de uma técnica “mais sofisticada”, o CLAE-EM, para solucionar estas questões, mas ressaltam que a mesma requer maior tempo de análise.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar a adequabilidade dos sistemas CLUE-TOF para utilização na análise de alimentos.

Objetivos específicos:

- Desenvolver método de análise de aflatoxinas por CLUE-TOF.
- Desenvolver um método de análise de cloranfenicol em mel por CLUE-TOF.
- Desenvolver um método de análise de melamina em leite por CLUE-TOF.
- Desenvolver um método de análise de tetraciclina em leite por CLUE-TOF.
- Desenvolver um método de análise de histamina em vinho por CLUE-TOF.
- Desenvolver um método de análise de ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva por CLUE-TOF.
- Desenvolver métodos de análise de padrões cromatográficos de betacaroteno e zeaxantina e retinol por CLUE-TOF.
- Desenvolver métodos de análise de padrões cromatográficos de antocianinas por CLUE-TOF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SOLVENTES ORGÂNICOS, ÁGUA, REAGENTES E PADRÕES

Foram utilizados solventes grau “HPLC” e “LCMS” Tedia, J. T. Baker; Scharlau e Merck. Reagentes utilizados: ácido fórmico Merck grau “LCMS”, ácido fórmico Tedia grau CLAE, 96 %; formiato de amônio “for Mass Spectroscopy puriss” PA Fluka; ácido fosfórico PA Vetec; cloreto de potássio 99 % J. T. Baker.

Toda solução injetada no sistema, com exceção da fase móvel, foi filtrada em filtro de seringa Millipore de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou nylon 0,22 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro para evitar entupimento do sistema cromatográfico e dos capilares da fonte de íons.

Água ultra pura obtida de sistema Milli-Q A10 Millipore e água “LCMS” Chromasolv Fluka.

A qualidade da água e dos solventes foi avaliada pela identificação dos íons e contagem dos mesmos nos espectros de massas obtido no CLUE-TOF da seguinte forma: adição de ácido fórmico de forma que a concentração final deste fosse 0,1 % (v:v). A análise foi realizada por infusão direta, fluxo 5,0 µL/min, e bombeamento através do sistema cromatográfico, com fluxo 0,3 mL/min, coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 50 X 2,1 mm, temperatura 45 °C. Parâmetros de fonte: capilar 3,0 kV, cone 25. O fluxo e a temperatura do nitrogênio de secagem foram ajustados de acordo com o fluxo de entrada da amostra: 750 L/h e 500 °C para fluxo de 0,3 mL/min, e 250 L/h e 300 °C para fluxo de 5 µL/min. Com a inserção no EM através do sistema cromatográfico foi avaliado com 100 % água, 100 % solvente orgânico e mistura 50: 50 (v:v).

Padrões comerciais utilizados: cloranfenicol Merck “Bioquímica” > 99 %; acetato de retinol Sigma 90 %; palmitato de retinol DSM 1700000 UI; dicloridrato de histamina Sigma >99 %; melamina Aldrich 99 % e cloridrato de tetraciclina Sigma-Aldrich “BioReagent” >95 % e aflatoxinas Romer Labs “Biopure” 2 µg/mL.

4.2 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity, Waters, que consiste num sistema composto por duas bombas binárias com gradiente de alta pressão, degaseificador de fase móvel, injetor automático com

sistema de lavagem independente (“off line”) integrado ao módulo controlador e forno para coluna, acoplado em um espectrômetro de massas híbrido QTOF Synapt, Waters com fonte de ESI com sistema de correção de massas “lockspray” e bomba de seringa acoplada. O gás de nebulização e secagem utilizado foi o nitrogênio, fornecido por um gerador Peak modelo NG10L-HP. O sistema CLUE-TOF foi controlado pelo software MassLinx (Figura 16).



Figura 16. Sistema CLUE-TOF utilizado: UPLC Acquity-Synapt, Waters. Fonte: Arquivo pessoal.

Para comparação entre os sistemas CLUE-TOF CLUE com detecção por UV na análise de tetraciclinas foi utilizado um cromatógrafo do tipo modular Shimadzu Nexera CLUE, constituído de duas bombas LC-30AD, gradiente de alta pressão, degaseificador de fase móvel DGU-20A₃, sistema de injeção automática de amostra SIL-30AC, forno para coluna CTO-20A, detector UV/VIS SPD-M20A e módulo controlador/interface CBM-20A. Esse sistema é controlado pelo software LabSolutions (Figura 17).

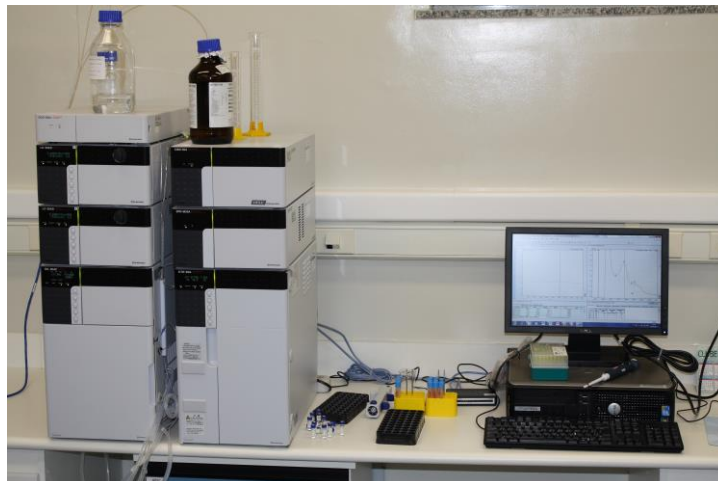


Figura 17. Sistema CLUE com detecção por UV Shimadzu Nexera utilizado para análise de tetraciclina em leite. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de amendoim para análise de aflatoxinas, mel para análise de cloranfenicol, leite para análise de melamina e tetraciclina, vinho para análise de histamina e fenólicos, suco de uva para análise de fenólicos, betacaroteno, zeaxantina e retinol para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular e antocianinas para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular foram preparadas conforme seções adiante:

4.3.1 Preparo da amostra de amendoim para análise de aflatoxinas

A amostra de amendoim comercial adquirida em mercado varejista do Rio de Janeiro foi triturada em mini moinho e em seguida uma alíquota de 25 g foi pesada em erlenmeyer e foram adicionados 100 mL de solvente de extração (ACN:água 84:16, v:v). O erlenmeyer foi agitado em “shaker” por 30 minutos e em seguida foi feita uma filtração em papel de filtro para béquer com a ajuda de um funil. Uma alíquota de 5 mL de cada filtrado foi passada por coluna Mycosep 224 Aflazon da Romer Labs para purificação. O volume de 2 mL de cada extrato purificado foi transferido para vials de 5 mL. A solução foi então seca sob fluxo nitrogênio e ressuspensa para 500 μ L de solução de fase móvel do método de aflatoxinas desenvolvido, ACN: água, 50:50, (v:v), e transferida para vial de injetor automático.

Os padrões de aflatoxinas foram preparados na forma de “pool”, em uma solução estoque com concentração total de 1262,5 μ g/L, em ACN. Esta foi diluída 10

e 100 vezes para preparar as soluções de injeção no cromatógrafo e acrescentadas à matriz sem analito, previamente analisada, para avaliação da resposta e da diminuição do efeito de matriz.

4.3.2 Preparo da amostra de mel para análise de cloranfenicol

Amostra de mel: Duas alíquotas de 5 g de mel comercial adquirido em mercado varejista do Rio de Janeiro foram pesadas em tubos de centrífuga de 50 mL separados e solubilizados em 10 mL de água ultra pura. Em seguida foram adicionados 10 mL de ACN em um dos tubos e 10 mL de acetato de etila ao outro. Em ambos foram acrescentados 2,5 g de cloreto de potássio. As misturas foram agitadas em vórtex por 10 segundos e centrifugadas a 10 krpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante de ambos (ACN ou acetato de etila) foi coletado com auxílio de pipeta, transferido para frascos de vidro e evaporado sob fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi ressuscitado em 100 µL de fase móvel do método de cloranfenicol desenvolvido, água: MeOH, 70:30 (v:v) e 10 mM de formiato de amônio, e transferido para vial de injetor automático.

O padrão de cloranfenicol foi preparado em MeOH, como solução estoque a 1 µg/mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para os testes, em ACN, ou adição à amostra isenta de analito, previamente analisada, para realização dos ensaios.

4.3.3 Preparo da amostra de leite para análise de melamina

Para análise de melamina uma alíquota de 5 g de leite em pó comercial, adquirido em mercado varejista do Rio de Janeiro, foi pesada em tubo para centrífuga de 50 mL e submetida a procedimento de extração de acordo com método adaptado de Smoker e Krynistky (2008). Ao tubo foi adicionado 20 mL de solução 50:50 de ACN:água (v:v) e 2,5 g de cloreto de potássio. A mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos e depois centrifugada a 10 krpm a 4 °C por 10 minutos para acelerar a separação das fases. O sobrenadante foi coletado em frasco de vidro e seco sob fluxo de nitrogênio, em seguida foi ressuscitado em 100 µL de ACN e transferido com auxílio de pipeta para vial de injetor automático.

O padrão de melamina foi preparado na forma de solução estoque de 1 µg/mL em solução de ACN: água, 50:50 (v:v), e em seguida diluído para as concentrações utilizadas nos experimentos na mesma solução de ACN: água.

4.3.4 Preparo da amostra de leite para análise de tetraciclina

Para análise de tetraciclina uma alíquota de 5 mL de leite do tipo UHT comercial, adquirido em mercado varejista do Rio de Janeiro, foi transferida para tubo de centrífuga de 50 mL com auxílio de pipeta automática, e em seguida adicionou-se 10 mL de ACN e 150 µL de ácido fórmico Merck (ou 156 µL de ácido fórmico Tedia) e 2,5 g de cloreto de potássio. A mistura para extração foi colocada em banho de ultrassom por 10 minutos e em seguida foi centrifugada a 10 krpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em frasco de vidro, seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 100 µL de fase móvel nas condições iniciais do gradiente do método de análise de tetraciclina desenvolvido para CLUE-TOF ou CLUE: 95 % de fase A (solução de ácido fórmico 1 %) e 5 % de fase B (50:50 água: MeOH (v:v)) para CLUE-TOF ou 90 % de fase A (solução 0,5 % de ácido fórmico) e 10 % de fase B (MeOH).

O padrão de tetraciclina foi preparado na forma de solução estoque 1 µg/mL em solução 50:50 (v:v) MeOH: água e a partir desta foram realizadas diluições em fase móvel na condição inicial de gradiente ou adição direta à amostra isenta de analito, previamente analisada.

4.3.5 Preparo da amostra de vinho para análise de histamina, ácidos orgânicos e fenólicos e suco de uva para análise de fenólicos

Amostra de vinho e suco de uva: As amostras de vinho, tanto para análise de histamina quanto de ácidos orgânicos e fenólicos, e de suco de uva para análise de ácidos orgânicos e fenólicos foram tratadas da mesma maneira. Uma alíquota de 5 mL de amostra de vinho ou suco de uva comercial, adquirido em mercado varejista do Rio de Janeiro foi filtrada em filtro de seringa Millipore de PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro para um frasco de vidro. Em seguida retirou-se uma alíquota de 100 µL que foi transferida para vial de injetor automático e diluiu-se em 900 µL de fase móvel nas condições iniciais de gradiente: 60 % de fase A

(ácido fórmico 0,1 % em ACN) e 40 % de fase B (solução de ácido fórmico 0,1 %) para análise de histamina e 73 % de fase A (solução 10 mM de formiato de amônio) e 27 % de fase B (10 mM de formiato de amônio em MeOH) para análise de ácidos orgânicos e fenólicos.

Foram analisadas para histamina treze amostras de vinho. Três vinhos importados (um do Chile e dois de Portugal), quatro da região da Serra Gaúcha e seis da região do Vale do Rio São Francisco, conforme a Tabela 7:

Tabela 7. Vinhos analisados quanto a presença e quantificação de histamina.

Amostra de vinho	Tipo	Origem	Ano
Histamina_1	Tinto, Seco	Chile	2010
Histamina_2	Branco, Verde	Amarante, Portugal	2007
Histamina_3	Tinto, Suave	Serra Gaúcha, Brasil	-
Histamina_4	Tinto, Seco	Dão, Portugal	2007
Histamina_5	Tinto, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	-
Histamina_6	Tinto, Suave	Serra Gaúcha, Brasil	-
Histamina_7	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_8	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_9	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_10	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_11	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_12	Tinto, Seco	Vale do São Francisco, Brasil	-
Histamina_13	Branco, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	-

Já para análise de ácidos orgânicos e fenólicos foram avaliadas qualitativamente dezoito bebidas derivadas de uva, sendo onze vinhos tintos (sete vinhos da região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul; um de Mendoza, Argentina; um de Dão, Portugal; um de Santana do Livramento, Rio Grande do Sul; um da região do Porto, Portugal; um da região de Bordeaux, França). Quatro vinhos brancos (três espumantes prosseco da região da Serra Gaúcha e um "icewine", canadense) e dois sucos de uva nacionais da região da Serra Gaúcha (Tabela 8).

Tabela 8. Vinhos e sucos de uva analisados para ácidos orgânicos e fenólicos.

Amostra	Tipo	Origem	Ano
Vinho_1	Tinto, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	2009
Vinho_2	Tinto, Seco	Mendoza, Argentina	2007
Vinho_3	Tinto, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	2007
Vinho_4	Tinto, Seco	Dão, Portugal	2007
Vinho_5	Tinto, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	2011
Vinho_7	Tinto, Seco	Santana do Livramento, Brasil	2009
Vinho_8	Tinto, Suave	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_9	Branco, Seco	Canadá	-
Vinho_11	Tinto, Seco	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_12	Tinto, Suave	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_13	Porto, Ruby	Portugal	-
Vinho_14	Tinto, Seco	Bordeaux, França	-
Vinho_15	Tinto, Suave	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_16	Espumante, Prosecco	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_17	Espumante, Prosecco	Serra Gaúcha, Brasil	-
Vinho_18	Espumante, Prosecco	Serra Gaúcha, Brasil	-
Suco_1	Suco, Integral	Serra Gaúcha, Brasil	2011
Suco_2	Suco, Integral	Serra Gaúcha, Brasil	2011

O padrão de histamina foi preparado na forma de uma solução estoque de 525 µg/mL em HCl 0,1M. A partir desta solução diluiu-se 10 vezes em HCl 0,1M, obtendo-se as soluções a partir das quais foram retiradas alíquotas para construção da curva analítica e os outros ensaios, inclusive adição à amostra isenta de analito, previamente analisada. A curva analítica foi preparada através da adição de padrão à amostra, isenta de histamina, previamente analisada.

4.3.6 Preparo das amostras de betacaroteno, zeaxantina e retinol para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular

Foram avaliados qualitativamente padrões de betacaroteno, zeaxantina e retinol produzidos no próprio laboratório. Os padrões de carotenóides foram obtidos por cromatografia em coluna aberta e avaliados por CLAE com detecção por VIS segundo trabalho de Pacheco (2009). O retinol foi extraído de fígado bovino, o extrato foi saponificado, reextraído e purificado por CLAE segundo trabalho de Dias (2012). Os padrões foram armazenados secos em ampolas seladas e com atmosfera de nitrogênio a -20 °C. Para se proceder à análise os carotenóides foram diluídos em acetona e o retinol foi diluído em fase móvel ACN: água 50:50 (v:v) e ácido fórmico 0,1 % (v:v) em concentração aproximada de 1 µg/mL.

4.3.7 Preparo das amostras de antocianinas para avaliação da pureza e confirmação da fórmula molecular

Foram avaliados qualitativamente padrões de antocianinas produzidos no próprio laboratório. Os padrões de antocianinas foram extraídos de diversas matrizes e isolados por CLAE, segundo trabalho de Gouvêa e outros (2012). Para se proceder à análise as antocianinas foram diluídas em fase móvel 73 % de fase A e 27 % de fase B. Fase A solução de ácido fórmico 0,1 % (v:v) e Fase B metanol. A concentração utilizada foi de aproximada 1 µg/mL.

4.4 PREPARO DA CURVA ANALÍTICA PARA TETRACICLINA EM LEITE

Foi preparada uma curva analítica para a análise de tetraciclina em leite. Os pontos da curva analítica foram preparados em matriz isenta de analito, previamente analisada, a partir de amostra comercial de leite UHT adquirida em mercado varejista do Rio de Janeiro. À alíquotas da matriz foram adicionados volumes de solução padrão como mostra a Tabelas 9. A matriz fortificada foi submetida ao mesmo preparo de amostra descrito no item 4.3.4, acima, e em seguida analisada. Para a confecção da curva foram utilizados pontos em triplicata.

Tabela 9. Pontos da curva analítica de tetraciclina.

ponto	ng/mL*	volume de padrão** (µL)	volume de amostra (µL)
1	12,5	62,5	4937,5
2	25,0	125,0	4875,0
3	50,0	250,0	4750,0
4	75,0	375,0	4625,0
5	100,0	500,0	4500,0

* concentração de tetraciclina no leite

** solução padrão 1 µg/mL

A faixa de trabalho foi determinada de acordo com os valores médios encontrados na literatura para até o máximo permitido pela legislação brasileira que é de 100 µg/mL.

A validade do modelo de regressão linear obtido foi avaliada pelo teste de Cochran para homocedasticidade, e testes de significância da regressão, falta de ajuste, normalidade da distribuição e independência dos resíduos por testes estatísticos utilizando o software Action.

4.5 PREPARO DA CURVA ANALÍTICA PARA HISTAMINA EM VINHO

Foi preparada uma curva analítica para a análise de histamina em vinho. Os pontos da curva analítica foram preparados em matriz isenta de analito, previamente analisada, a partir de amostra comercial de vinho adquirida em mercado varejista do Rio de Janeiro. À alíquotas da matriz foram adicionados volumes de solução padrão como mostra a Tabelas 10. A matriz fortificada foi submetida ao mesmo preparo de amostra descrito no item 4.3.5, acima, e em seguida analisada. Para a confecção da curva foram utilizados pontos em triplicata.

Tabela 10. Pontos da curva analítica de histamina.

ponto	ng/mL*	volume de padrão** (µL)	volume de amostra (µL)
1	0,525	50,0	4950,0
2	1,525	14,5	4985,5
3	3,525	33,6	4966,5
4	5,525	52,6	4947,4
5	7,525	71,7	4928,4
6	9,525	90,7	4909,3

* concentração de histamina no vinho

** solução padrão de 52,5 µg/mL para o ponto 1 e 525 µg/mL para os outros

A faixa de trabalho foi determinada baseando-se no valor médio de histamina presente em vinho encontrado na literatura.

A validade do modelo de regressão linear obtido foi avaliada pelo teste de Cochran para homocedasticidade, e testes de significância da regressão, falta de ajuste, normalidade da distribuição e independência dos resíduos por testes estatísticos utilizando o software Action.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de haver trabalhos na literatura que utilizam CLUE-TOF para análise de alimentos, a presente tese teve origem nas dificuldades encontradas em se reproduzir essas análises, ou mesmo desenvolver novos métodos após aquisição deste equipamento pelo laboratório e instalação.

A importância do TOF reside na necessidade de se obter informação estrutural dos analitos já estudados pelo laboratório por CLAE. O acoplamento do TOF com o CLUE traz agilidade e permite eliminar etapas de preparo de amostra obtendo-se rapidamente resultados de alta confiabilidade. Entretanto, mesmo após o treinamento operacional dado pela empresa fabricante do equipamento, e mesmo os membros do laboratório tendo ampla experiência em CLAE e EM, não se conseguia observar o sinal dos analitos nas análises. A motivação para este estudo foi então identificar se seria possível a utilização deste tipo de equipamento na rotina do laboratório, tendo em vista a necessidade de se analisar matrizes complexas de alimentos, identificar meios de contornar a inibição de ionização, que logo no início foi identificada como principal fator de supressão do sinal dos analitos e a possibilidade de utilizar esse sistema hifenado para desenvolver métodos superiores aos encontrados na literatura em termos de confiança e rapidez de resultados.

A qualidade dos solventes utilizados, tanto no tratamento da amostra como nas análises em sí, se mostrou de fundamental importância na supressão da ionização.

Para que fosse possível alcançar o objetivo geral diversos métodos analíticos foram desenvolvidos, englobando diferentes matrizes de alimentos: análise de resíduos e contaminantes utilizando como matrizes amendoim, mel, leite e vinho; identificação e quantificação de compostos bioativos, utilizando como matriz vinho e suco de uva, escolhidas devido à complexidade e à demanda de tempo da análise.

Atualmente, uma das principais dificuldades de se obter resultados analíticos confiáveis se deve a baixa qualidade dos padrões analíticos utilizados. Na maioria das vezes estes padrões são importados, processo demorado e burocratizado e que, no Brasil, muitas vezes acaba sujeitando estas substâncias a condições desfavoráveis de conservação alterando seu teor e levando a produção de substâncias interferentes. Devido a este fato muitos laboratórios tem efetuado a síntese ou isolamento e purificação dos padrões no próprio laboratório. A

confirmação da identidade destes padrões isolados por espectrometria de massas é de grande importância tendo em vista que as técnicas utilizadas para isolamento e caracterização, CLAE, coluna aberta e espectrofotometria no UV/VIS, utilizam apenas parâmetros gerais inespecíficos, como o t_R , que é função da estrutura molecular do analito, mas que pode haver coeluição, e a absorvância de radiação UV/VIS que é função do cromóforo da molécula, e não da estrutura geral, sendo que o cromóforo é compartilhado por outras moléculas da mesma classe.

Portanto, os trabalhos descritos nesta tese foram executados na seguinte ordem cronológica:

- Análise da qualidade dos solventes e da água e avaliação da presença de contaminantes (“ruído químico”) e supressão de ionização;
- Desenvolvimento dos métodos analíticos incluindo preparo da amostra utilizando solventes e aditivos adequados para CLUE-TOF;
- Desenvolvimento dos métodos para análise dos padrões produzidos no próprio laboratório;
- Avaliação dos dados obtidos a partir dos métodos desenvolvidos.

Outros problemas tiveram de ser contornados durante os trabalhos como a facilidade de “carry over”, que é a contaminação do sistema com o próprio analito e a facilidade de entupimento dos capilares da fonte do EM.

Esses equipamentos possuem “volume morto” muito reduzido em relação aos convencionais, especialmente devido ao diâmetro interno dos tubos e conexões ser muito menor que do CLAE justamente para evitar o máximo possível o alargamento dos picos cromatográficos. O problema aparece quando se utiliza soluções “concentradas”, que demandam grande quantidade de solvente para diluição das substâncias presentes nestas soluções e que ficam aderidas às paredes dos tubos e conexões. Nesses casos o volume de solvente que passa pelas tubulações é pequeno, que associados ao rápido tempo de análise se tornam insuficientes para fazer a limpeza completa durante uma corrida.

Identificou-se que quase sempre que se injetava soluções em concentrações acima de 0,1 ng/mL havia sério “carry over”, que demandava interrupção dos estudos e a limpeza do sistema com solvente até o desaparecimento dos sinais. Observa-se na literatura que muitos equipamentos do mesmo tipo são mais

tolerantes à essa concentração, enquanto outros são mais sensíveis, sendo portanto de extrema importância a verificação das particularidades de um dado sistema antes do início dos trabalhos.

Trabalhar com soluções diluídas no início do desenvolvimento de um método é difícil porque muitas vezes, mesmo utilizando-se padrões puros solubilizados em solventes de alta pureza, o sinal do analito não aparece no espectro de massas até que se encontre o ajuste perfeito dos parâmetros principais da fonte de íons que induzem à formação dos íons e sua transferência para a fase gasosa. Estes parâmetros são: o potencial do capilar de aço da fonte, o potencial do cone e a temperatura e fluxo do gás de dessolvatação, o nitrogênio.

É de conhecimento público que o entupimento dos capilares da fonte ocorre muito facilmente se não houver filtração das amostras, ou se houver utilização de sais, portanto, além de ter sido utilizada sempre a filtração, evitou-se o máximo a utilização de sais.

A calibração do TOF para trabalhar com alta exatidão das massas também foi um grande problema por ser contornado. Esse tipo de analisador de massas é muito sensível a variações de temperatura da sala e na rede elétrica. Só foi possível manter a estabilidade da calibração após adequação da rede com um estabilizador de voltagem exclusivo para este equipamento e a instalação de um aparelho de ar condicionado que conseguiu manter a temperatura da sala em torno de 25 °C, com variações de no máximo 3 °C.

A solução de calibração do TOF sugerida pelo fabricante, solução de formiato de amônio em acetonitrila, entupia facilmente o capilar de aço inox da fonte. A forma encontrada para resolver este problema foi utilizar outra solução de calibração: ácido fosfórico 1 % (m/v) em solução de ACN:água 50:50 (v/v). O ácido fosfórico é bem mais solúvel em água: acetonitrila do que o formiato de amônio, evitando que a evaporação do solvente que ocorre na ponta do capilar que termina na fonte de íons concentre a solução a um nível em que haja precipitação. Esses entupimentos costumam ocorrer ao final da injeção da solução, após a interrupção do fluxo, quando o calor do bloco da fonte, que costuma operar em temperaturas próximas a 100 °C, evapora o solvente que fica estagnado na ponta do capilar de aço.

5.1 ANÁLISE DA QUALIDADE DOS SOLVENTES ORGÂNICOS E DA ÁGUA

A avaliação da qualidade dos solventes utilizados em CLAE-EM se mostrou essencial para qualquer análise. Diferentemente da técnica CG-EM, em que o gás de arraste praticamente não apresenta sinal, os solventes utilizados em CLAE-EM contém muitas substâncias dissolvidas que resultam num sinal contínuo – para análises isocráticas – gerando o “ruído químico” – observado nesse tipo de análise. Isso ocorre mesmo com os solventes disponíveis de mais alta pureza, como os grau “LC-MS” fornecidos especialmente para essa técnica. Quando se utiliza EM do tipo Q, ou QqQ, não existe o impacto visual no espectro de massas do ruído químico dos solventes, pois esse tipo de analisador filtra apenas os íons, ou transições de interesse para a análise. Já nas análises que utilizam EM com analisadores de alta resolução, e que não operam em varredura, o impacto visual do ruído químico no espectro de massas é grande, muitas vezes não sendo possível visualizar facilmente o sinal de m/z dos analitos. Além disso, a presença de uma alta quantidade de interferentes na fase móvel pode resultar na supressão da ionização dos analitos, pois diferentemente do que ocorre com o efeito de matriz, que pode ser eliminado através de uma boa cromatografia, os interferentes da fase móvel fluem de maneira contínua pelo cromatógrafo chegando à fonte juntamente com os analitos (STEWART e WILLIAMSON, 2001).

Nos espectros de massas das Figuras 18, 19, 20 e 21 pode-se observar os contaminantes mais comumente encontrados em grande quantidade nos solventes orgânicos e na água. Observou-se a ampla presença de sinais de plastificantes, presentes em borrachas de vedação, com m/z característico 522 e 550, estearamida, de m/z 284, oriunda de filmes de polietileno, o m/z 149 do anidrido ftálico, e um outro plastificante, íon de m/z 104, que resulta da complexação da acetonitrila com Cu^+ . Algumas vezes foi observada contaminação com polietilenoglicol (PEG).

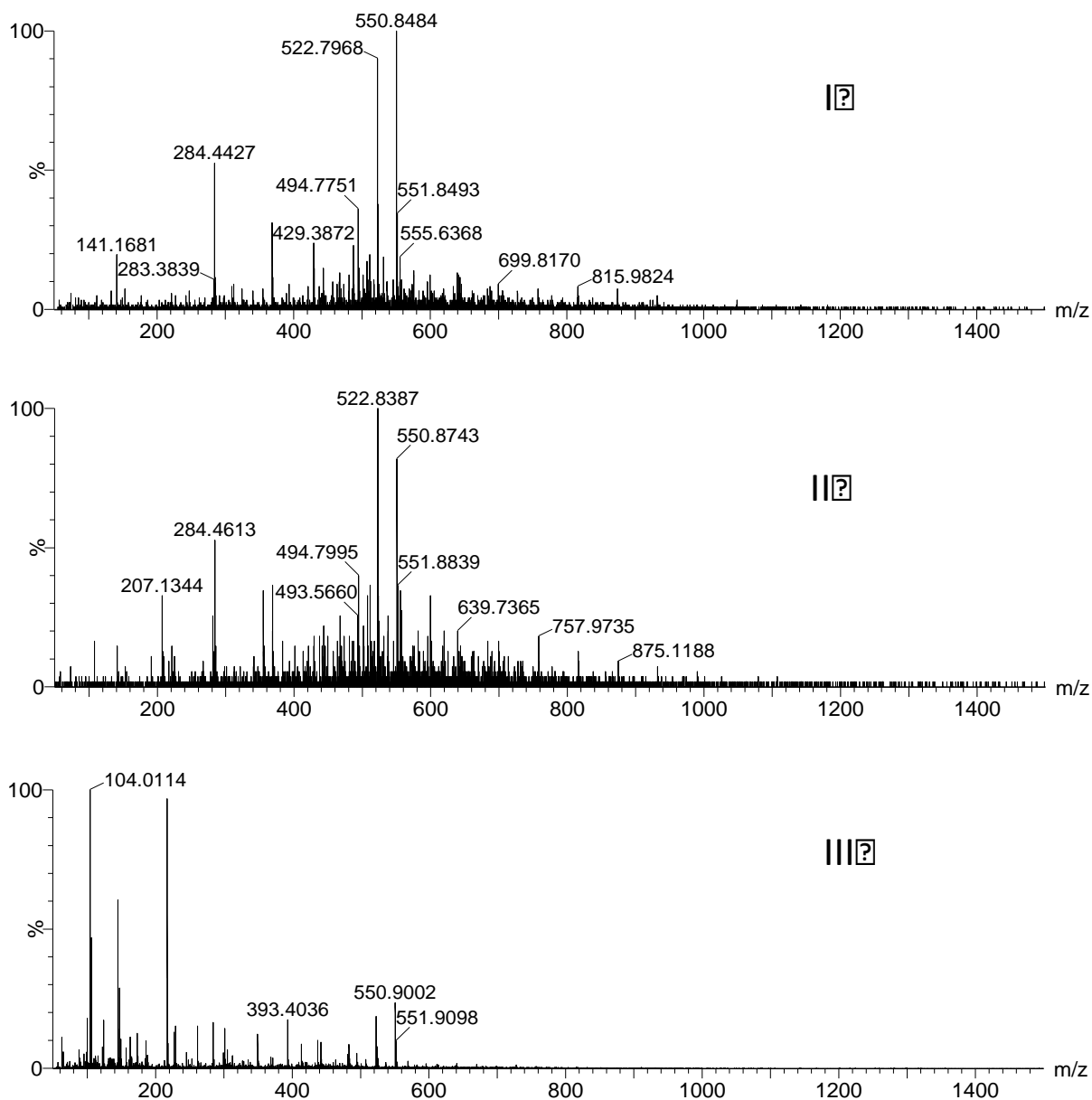


Figura 18. Espectros de massas mostrando contaminantes presentes na acetonitrila. I marca A grau LC-MS, corrente iônica total 122; II marca A grau HPLC corrente iônica total 55; e III marca B grau HPLC, corrente iônica total 2530.

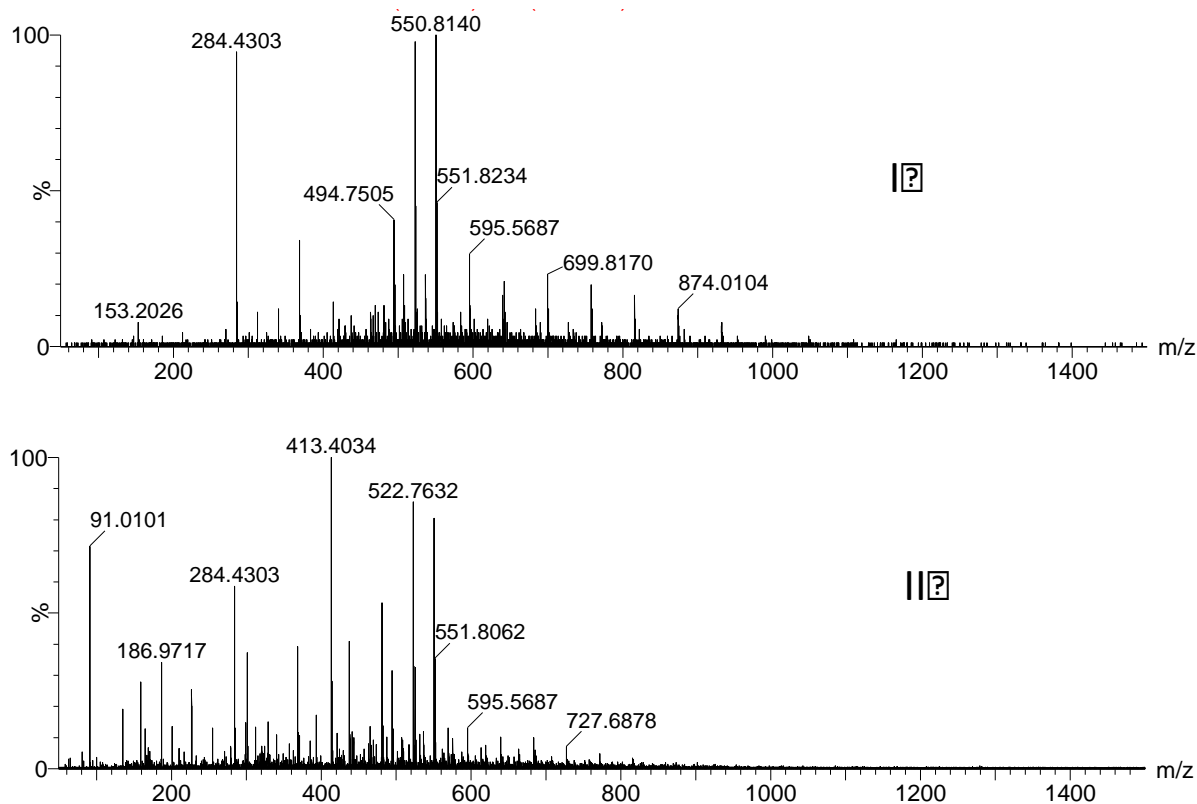


Figura 19. Espectros de massas mostrando contaminantes presentes em metanol. I marca B grau HPLC, corrente iônica total 91 e II marca A grau LC-MS, corrente iônica total 413.

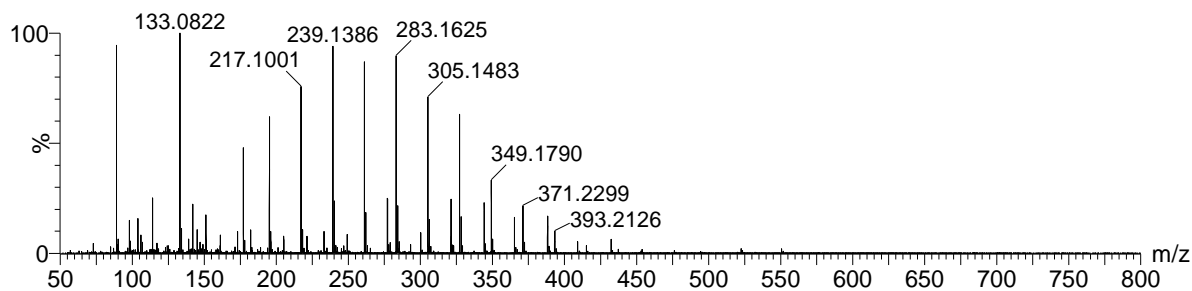


Figura 20. Espectros de massas mostrando contaminação por PEG na acetonitrila da marca B, grau HPLC que seria utilizada análise de histamina por HILIC. Corrente iônica total 2610.

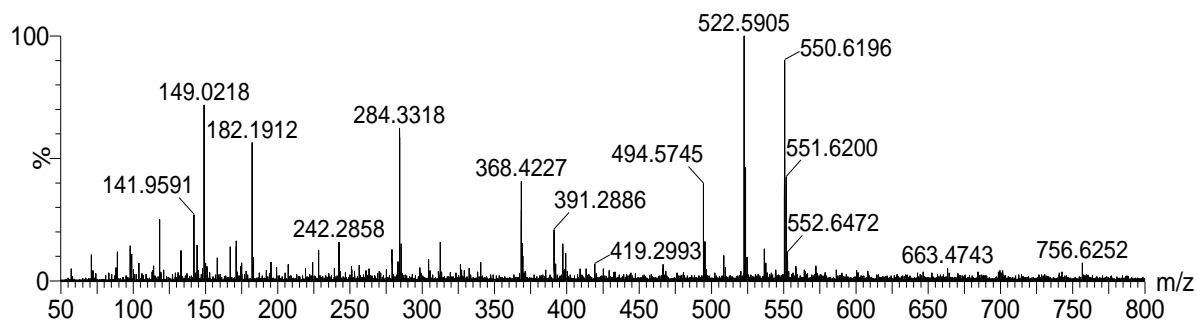


Figura 21. Espectro de massas mostrando contaminantes presentes em quantidade tolerável na fase móvel. Condições iniciais da análise de histamina por HILIC utilizando-se acetonitrila grau HPLC da marca B.

A análise dos solventes mostrou que pode haver grande variação na sua qualidade. Há grande variação entre marcas, mas de mesma especificação, mas também dentro de um mesmo lote, sem variar a marca e o tipo. Essa variação se dá basicamente na quantidade dos contaminantes, que em geral se mantém os mesmos. Por outro lado, não se observou, diferença significativa entre os solventes grau “HPLC” e “LC-MS”. Em uma determinada ocasião frascos diferentes de um mesmo lote de acetonitrila, apresentaram qualidades diferentes. A acetonitrila de alguns frascos de um determinado lote da marca B (Figura 20) apresentou sinal de contaminação por (PEG) identificados por uma série de picos com diferença de 44 Da. A contaminação por PEG é crítica, pois sendo uma substância facilmente ionizável causa grande supressão de ionização dos analitos. Essa substância é comumente encontrada em detergentes comerciais convencionais. Deve-se evitar o contato desse tipo de produto com todo o material a ser utilizado nas análises por EM.

A análise da água ultra pura indicou que não há diferença entre a água comercial grau “LC-MS” analisada e a água ultra pura fornecida pelos sistemas Milli-Q.

Um resultado inesperado foi a quantidade elevada de ftalatos (m/z 149, 195) nas membranas/ cartuchos recém trocados, verificando-se uma contagem do pico base menor após algumas semanas de uso, indicando um resíduo do plastificante nos cartuchos trocados provavelmente provenientes da manufatura. O período de troca dos cartuchos pode ser facilmente identificado através do aumento da contagem do pico base no espectro.

Em geral os solventes orgânicos apresentaram contagem total de íons maior do que a água ultra pura. Observa-se que os íons encontrados com sinal mais forte (Figura 21 m/z 149, 284, 522, 550) em sua maioria pertencem a aditivos utilizados na composição de plásticos e borrachas. Naturalmente a solubilidade dessas substâncias é maior nos solventes orgânicos, explicando esse dado. De fato, quando se realiza uma análise com eluição gradiente em RP observa-se um aumento gradativo na linha de base do TIC, o contrário ocorre com análises HILIC, onde a proporção de solvente orgânico diminui ao longo do gradiente.

Alguns fabricantes de equipamentos de CLAE-EM já fornecem bibliotecas de identificação de substâncias para seus equipamentos. Equipamentos de alta resolução fazem a identificação através da comparação dos dados e massa exata obtidos com os da biblioteca. Já equipamentos baseados em quadropolos utilizam a fragmentação para identificação e comparação com a biblioteca. Nesses casos, a presença de picos de interferentes também atrapalha a comparação e identificação exata do analito pela biblioteca.

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLUE-TOF

5.2.1 Desenvolvimento dos métodos

O desenvolvimento dos métodos analíticos foi iniciado com a otimização dos parâmetros mais importantes da fonte de íons que influenciam na ionização dos analitos e sua transferência para fase gasosa. Para análises em modo ESI positivo os padrões comerciais de contaminantes e resíduos, e padrões de retinol e antocianinas foram solubilizados em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1 %. Para ESI negativo os padrões foram solubilizados em solução 10 mM de formiato de amônio. A concentração máxima das soluções injetadas foi 1 $\mu\text{g/mL}$. Para os padrões de carotenóides foi utilizada solução de acetona:metanol (MeOH) 90:10 com 0,1 % de ácido fórmico (v/v). Também utilizou-se soluções de no máximo 1 $\mu\text{g/mL}$.

A otimização da fonte foi realizada através da infusão direta da solução padrão preparada de acordo com o parágrafo acima com fluxo de 5 $\mu\text{L/min}$. O sinal do íon alvo foi monitorado através da janela "chromatogram" do software Mass Linx pelo seu cromatograma de íon extraído (extracted ion chromatogram, ou CIE) e também pelo cromatograma de íons totais (total ion current chromatogram, TIC). Os

parâmetros ótimos de fonte foram sendo ajustados até que se obtivesse um equilíbrio entre o maior sinal de CIE e o menor sinal de TIC.

Em seguida desenvolveu-se o método cromatográfico, com ajuste dos parâmetros cromatográficos: tipo e tamanho da coluna, solventes para fase móvel, temperatura da coluna, tipo de eluição (gradiente ou isocrática) e fluxo do solvente. A mesma solução padrão utilizada na otimização dos parâmetros de fonte foi diluída para uma concentração entre 0,1 µg/mL e 1 µg/mL e injetada em volumes de 1, 2, 5 e 10 µL. Após alcançada a resolução cromatográfica desejada (visualização pelo CIE de um pico isolado, simétrico, e sem cauda) ajustou-se novamente os parâmetros da fonte, inserindo-se mais uma vez a solução padrão através da infusão direta, mas dessa vez juntando-se com uma conexão do tipo “T” o fluxo da infusão direta ao efluente da fase móvel nas mesmas condições cromatográficas do t_R de eluição do analito previamente encontradas, para que se pudesse otimizar os parâmetros da fonte com o analito sob a influência da fase móvel.

Os resultados foram avaliados extraindo do TIC os íons de interesse (CIE). Devido ao sinal dos interferentes da matriz ou das impurezas da fase móvel, na maioria das vezes não se observa no TIC o pico dos analitos como ocorre em uma análise por EM/EM, SIM, ou detecção convencional por UV, fluorescência, refratometria, etc. A contagem dos íons dos analitos é bem menor que a dos íons que formam o “background” da análise, pois o presente trabalho só analisou resíduos, contaminantes e outras substâncias presentes de forma minoritária na matriz. Apenas quando se trabalhou com os padrões se observou os picos de interesse nos TIC, entretanto, na maioria das vezes optou-se por trabalhar com soluções mais diluídas para se evitar o “carry over”.

Durante uma corrida analítica, observou-se que o erro de medida da massa variava bastante, mas só foram considerados resultados em que essa variação fosse no máximo 0,02 Da, valor recomendado pelo fabricante como garantia da estabilidade calibração do TOF.

Esse valor de 0,02 Da pode ser considerado um erro grande, 200 ppm para uma massa de 100 Da e 40 ppm para uma massa de 500 Da. Entretanto, quando se compara com o erro de analisadores do tipo Q esses valores vão a 9000 e 1800 ppm, para as massas de 100 Da e 500 Da, respectivamente. A confirmação dos picos dos analitos durante o desenvolvimento dos métodos foi feita com calibração externa da exatidão da massa, alcançando em todos os casos um valor menor que 5

ppm. A calibração para correção da massa foi feita com a mesma solução utilizada diariamente para calibrar o equipamento, solução de ácido fosfórico.

A outra forma de se obter o CIE foi fazendo uma “varredura” manual com o cursor na aba “chromatogram” e observando os sinais na aba “spectrum”. Quando era observado na aba “spectrum” um valor de m/z de interesse, ao se clicar com o botão direito do “mouse” no pico de interesse, aparece na aba “chromatogram” o sinal CIE do respectivo valor de m/z .

Através da ferramenta de subtração de “background” da aba “chromatogram” obteve-se o espectro de massas do pico do CIE sem a maior parte do sinal de interferentes e contaminantes.

5.2.2 Escolha das matrizes de alimentos e preparo das amostras

Com o intuito de se obter uma grande abrangência das áreas que envolvem análise de alimentos foram escolhidas amostras que servissem de matrizes para análise de contaminantes, resíduos e substâncias bioativas.

Foram desenvolvidos quatro métodos de análise de contaminantes: análise de aflatoxinas em amendoim, análise de cloranfenicol em mel, análise de melamina em leite e análise de histamina em vinho; um método de análise de resíduo: análise de tetraciclina em leite e um método de análise de substâncias bioativas encontradas em vinho e suco de uva. Foram desenvolvidos também métodos para avaliar a qualidade de padrões de betacaroteno, retinol e antocianinas isolados no próprio laboratório.

O preparo das amostras foi o mais simples possível por alguns motivos: agilizar as análises, reduzir o número de etapas no preparo das amostras para evitar mais contaminações, e diminuir o custo com colunas de extração em fase sólida (SPE) ou solventes para extração líquido-líquido (ELL). A não utilização de etapas de purificação facilitou também a avaliação da capacidade do CLUE utilizando colunas com partículas da fase estacionária do tipo sub 2 μm e core-shell de separar os analitos dos interferentes da matriz que causam supressão de ionização por efeito de matriz.

5.2.3 Desempenho dos métodos desenvolvidos

Quase todos os métodos não precisaram passar por etapas de purificação antes da injeção dos cromatógrafos. Apenas para as amostras de amendoim foram utilizadas colunas de imunoafinidade para purificação. O extrato de amendoim sem purificação pelo uso da coluna de imunoafinidade, após a concentração, apresentou alta supressão de ionização, não sendo possível alcançar o LD exigido pela legislação Europeia de 2 µg/kg para aflatoxinas individualmente e 4 µg/kg para o total (CE, 1996)

Com exceção dos métodos de análise de ácidos orgânicos e fenólicos em vinho e suco de uva e o de antocianinas as análises foram ultra rápidas, com tempo total menor do que 5 minutos. Mesmo assim, as duas análises mais demoradas citadas tiveram tempo total menor do que 10 minutos.

As análises ultra rápidas resultam em grande economia de tempo e em uma alta capacidade de análise de amostras num curto intervalo de tempo (“high-throuput”). Associadas à um fluxo baixo, resultam também em grande economia de solvente. A Tabela 11 demonstra a economia de tempo e de fase móvel dos métodos desenvolvidos quando comparados à métodos convencionais ou de CLUE encontrados na literatura.

Tabela 11. Economia de tempo e fase móvel proporcionada pelos métodos desenvolvidos.

MÉTODO	ECONOMIA %		REFERÊNCIA
	TEMPO	SOLVENTE	
Aflatoxinas	60	71	BELTRAN et al., 2011
Cloranfenicol	78	85	KAUFMANN et al., 2007
Melamina	81	93	CHAO et al., 2011
Tetraciclina	69	63	XU et al., 2008
Histamina	68	75	DANG et al., 2013
Fenólicos	89	93	DIAS, 2009

A comparação foi feita com os métodos mais rápidos citados anteriormente para cada analito.

Observa-se na Tabela 11 que mesmo em comparação com métodos mais recentes, os métodos desenvolvidos no presente trabalho resultaram em maior

economia de tempo e também de solvente, contribuindo para uma “química verde”, além de agilizar o preparo das amostras. Essas reduções foram resultado principalmente das diminuições no fluxo e no tempo de análise, favorecendo também economia na utilização da mão-de-obra que consegue analisar um número maior de amostras num mesmo período de trabalho. O método de XU e outros (2008) utiliza um fluxo de apenas 0,25 mL/min em CLAE, fluxo bem abaixo do normalmente utilizado, mas compatível com o CLUE. Isso promove economia de solvente, mas com esse fluxo baixo a eficiência na separação é menor do que a convencional, necessitando de um tempo maior para que haja separação adequada do analito.

Já Kaufmann e outros (2007) utilizam CLUE para realizar a separação, mas não conseguem alcançar a rapidez e a economia de solvente que o método desenvolvido por este trabalho para a mesma finalidade (análise de cloranfenicol) proporciona.

Já em relação ao preparo das amostras todas as extrações realizadas foram adaptadas para o CLUE-TOF de acordo com as restrições de uso de ácidos, tampões e aditivos pelo fabricante do equipamento e pela literatura (DOLAN, 2013; WATERS, 2013). Os sistemas CLAE-EM com fontes API, incluindo o CLUE-TOF não são compatíveis com sais não voláteis, ou mesmo os voláteis em concentração acima de 10 mM, que precipitam na fonte causando entupimento dos dutos e capilares. Outros aditivos da fase móvel, ou utilizados em extrações como o TFA ou EDTA causam forte supressão de ionização.

5.3 ANÁLISE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

5.3.1 Análise de aflatoxinas

Os métodos que tratam da análise de aflatoxinas envolvem, quase todos, etapas de purificação e derivatização, além da extração e das etapas de separação e detecção. Portanto, existe uma necessidade de simplificar essas análises para agilizar a obtenção de dados e facilitar a manipulação das amostras, possibilitando um maior número de amostras monitoradas. O amendoim foi escolhido como matriz de estudo por se tratar de alimento abundante no país e com grande demanda analítica.

Os dados relativos à otimização da fonte para análise de aflatoxinas estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros ótimos de fonte encontrados para análise de aflatoxinas em amendoim.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	3
Cone	38
Temperatura fonte (°C)	110
Temperatura desolvatação (°C)	500
Fluxo desolvatação (L/h)	750

O método cromatográfico desenvolvido utilizou eluição isocrática e como fase móvel acetonitrila e água na proporção de 50:50 (v/v) com adição de ácido fórmico de forma a se obter no final 0,1 % do ácido em solução (v/v). Os parâmetros cromatográficos obtidos são: fluxo 0,4 mL/min, coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 150 X 2,1 mm, 1,7 µm, 40 °C e volume de injeção 2 µL.

Com o método desenvolvido foi possível detectar as aflatoxinas B1, B2 e G1 e G2, em concentrações abaixo de 100 µg/kg de maneira rápida do que o encontrado na literatura. Na Figura 22 se encontram as estruturas das aflatoxinas detectadas.

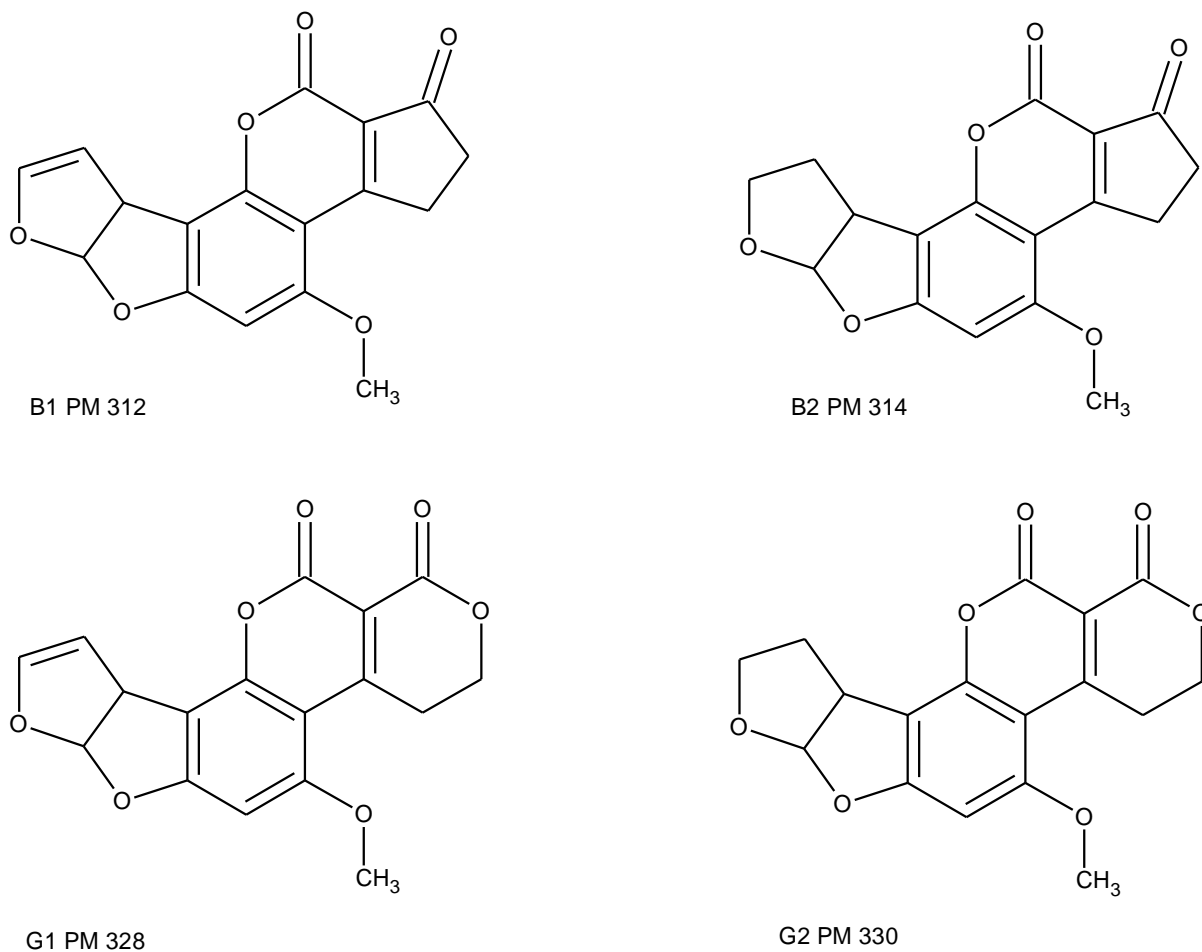


Figura 22. Estrutura das aflatoxinas detectadas pelo método desenvolvido.

A análise por ESI positivo foi possível devido à existência de vários oxigênios facilmente protonáveis nas condições do ESI, como as carbonilas e lactonas alfa beta insaturadas e os oxigênios dos éteres presentes em todas elas. As carbonilas destes grupos também permitem a coordenação com íons metálicos, sinais visualizados na Figura 23.

Observando os cromatogramas e espectros de massas das Figuras 23 e 24 pode-se verificar que nas eluições houve separação total dos picos das aflatoxinas B1 e G2, enquanto que as aflatoxinas B2 e G1 coeluíram. As aflatoxinas não puderam ser observadas pelo TIC (Figura 23, V). Os picos visualizados no TIC pertencem a componentes da matriz.

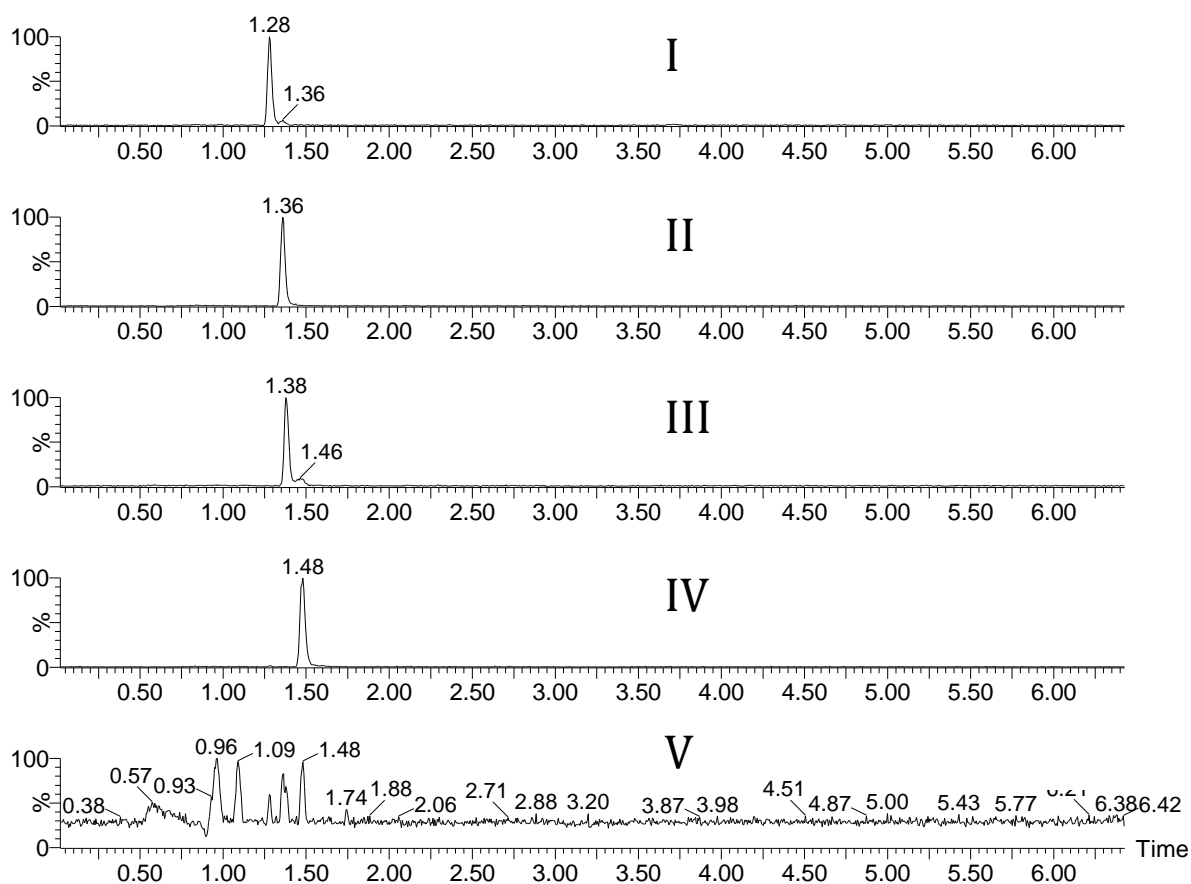


Figura 23. CIE das aflatoxinas analisadas pelo método desenvolvido. I Aflatoxina G2, II aflatoxina G1, III aflatoxina B2 e IV aflatoxina B1. V TIC da análise.

A coeluição não afeta a detecção das micotoxinas, pois a diferença na estrutura gera íons de m/z diferentes, o que permite extrair os íons de interesse (CIE) e fazer a integração do pico de um m/z específico para obtenção dos resultados quantitativos.

Entretanto, quando se avaliou os espectros de massas verificou-se que houve grande coordenação com sódio, resultando nas massas $[M + 23]^+$ observadas: m/z 353; 351; 337 e 335.

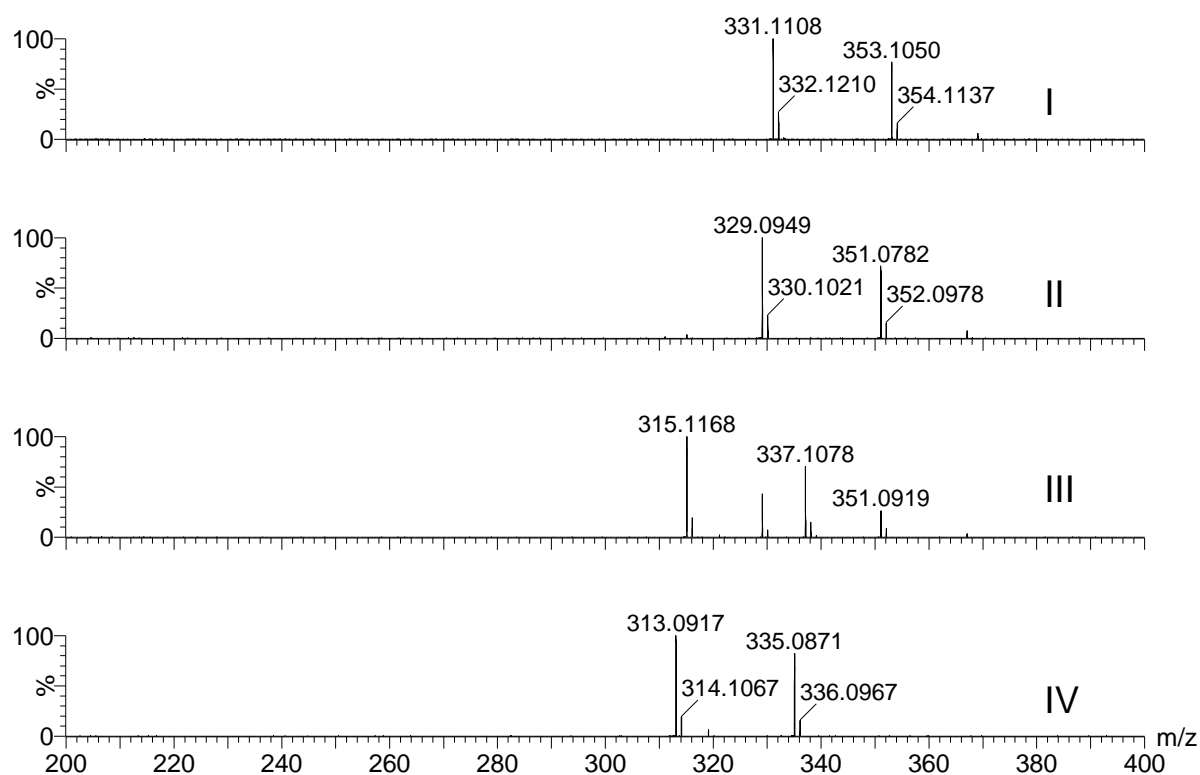


Figura 24. Espectros de massas extraídos dos CIE dos picos das aflatoxinas. I Aflatoxina G1, II aflatoxina G2, III aflatoxina B1 e IV aflatoxina B2.

A coordenação com o sódio ocorre mesmo com solução padrão diluída em água ultra pura e solvente grau “HPLC” ou “LC-MS”. Esse tipo de fenômeno pode atrapalhar a quantificação, uma vez que pequenas variações na quantidade de sódio da matriz alteram a quantidade do íon de quantificação. Nesses casos, para se aumentar o sinal do íon de quantificação, normalmente o mais intenso, que no caso das aflatoxinas foi a molécula protonada, utilizou-se o formiato de amônio na fase móvel. O amônio é capaz de deslocar o sódio de sua ligação com os analitos.

O íon do analito ligado ao amônio não foi observado no espectro. De fato, a presença de amônio na fase móvel aumenta o sinal da molécula protonada pela diminuição do aduto de sódio, entretanto, o aduto de amônio não chega ao detector do EM. Provavelmente, na fonte de íons, o amônio ($[\text{NH}_4]^+$) é liberado na forma de NH_3 deixando um próton ligado ao analito para formar a molécula deste protonada.

Comparando com o método de Beltran e outros (2011), percebe-se que a sensibilidade não é tão grande quanto a do método que utiliza QqQ. Beltran e outros alcançaram LQ de 0,025 µg/kg, enquanto que o presente método alcançou apenas 1 µg/kg. Contudo, esses valores foram suficientes para atender a legislação. Era de se esperar que o desempenho do método que utiliza QqQ fosse melhor, entretanto nota-se no texto do trabalho de Beltran e outros uma grande preocupação com falso positivos, evitando-se utilizar transições que pudessem levar à um equívoco na identificação como a perda de água e amônio. Já com a utilização do TOF a preocupação com falso positivos é muito menor, pois a alta resolução associada à alta exatidão da massa auxilia na garantia dos resultados.

Atualmente a comunidade europeia (CE, 2002) possui rígidos critérios para considerar uma amostra positivamente contaminada e a utilização da espectrometria de massas de alta resolução auxilia na garantia dos resultados devido à sua alta seletividade.

Os dados apresentados mostraram que pode-se utilizar essa técnica como uma rápida triagem semiquantitativa com resultados de alta seletividade, e serviram de base para o desenvolvimento de um método de avaliação de aflatoxinas em amostras de amendoim adquiridas em mercado varejista do Rio de Janeiro (BARRABIN, 2012), que comprovou a aplicabilidade da utilização do CLUE-TOF na análise desse tipo de contaminante.

5.3.2 Análise cloranfenicol em mel

Na apicultura, o cloranfenicol é utilizado para tratar as abelhas infectadas por doenças bacterianas, como no caso da doença de loque, que infecta larvas e promove a destruição da colmeia em poucos dias. O cloranfenicol também tem sido utilizado para aumentar a produtividade das abelhas, principalmente no verão, quando, devido às altas temperaturas, as abelhas tem uma tendência maior em se tornar doentes e por isso, letárgicas (RODZIEWICZ; ZAWADZKA, 2007). Para evitar riscos de contaminação humana a União Europeia estabeleceu que não há tolerância para o resíduo desta substância em alimentos e a banuiu do continente.

Em 2006 o mel brasileiro teve um alerta rápido da UE devido à contaminação com cloranfenicol (RASSF, 2013).

A estrutura do cloranfenicol (Figura 25) permite uma boa sensibilidade operando o ESI tanto no modo positivo como no modo negativo. Os oxigênios das hidroxilas permitem a protonação para se operar no modo positivo, e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida, vizinha aos cloros, tem certa acidez para que se permita operar a fonte ESI no modo negativo

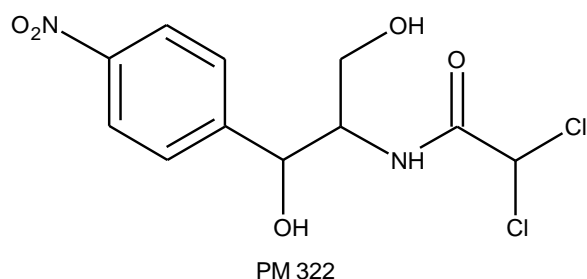


Figura 25. Estrutura do cloranfenicol.

Os parâmetros de fonte encontrados para cada um dos modos se encontram na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros ótimos de fonte ESI no modo positivo e no modo negativo encontrados para análise de cloranfenicol em mel.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	3
Cone	15
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	400
Fluxo desolvatação (L/h)	500
Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	-
Capilar (kV)	0,9
Cone	26
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	400
Fluxo desolvatação (L/h)	500

A operação em modo positivo permitiu identificar “clusters” com três íons principais, um padrão característico para substâncias que apresentam dois cloros na

molécula: $[M + H]^+$ (m/z 323), $[M + H + 2]^+$ (m/z 325) e $[M + H + 4]^+$ (m/z 327), sendo as proporções entre eles de 9:6:1, respectivamente (Figura 26 e na Figura 27).

Íons de m/z 323, 325, 327 e 329 representam os isótopos protonados de cloranfenicol. Outros dois “clusters” podem ser identificados. Um com o íon de maior intensidade de m/z $[M + 23]^+$ e outro com m/z $[M + 39]^+$ representando adutos de sódio e de potássio, respectivamente. Os íons de intensidade mais alta no espectro de massas do cloranfenicol no ESI positivo foram m/z 305, 307 e 309 que correspondem à perda de uma molécula de água a partir do íon $[M + H]^+$. O CIE do $[M + H]^+$ m/z 323 apresentou uma área de pico de 365,567 (concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Figura 28.

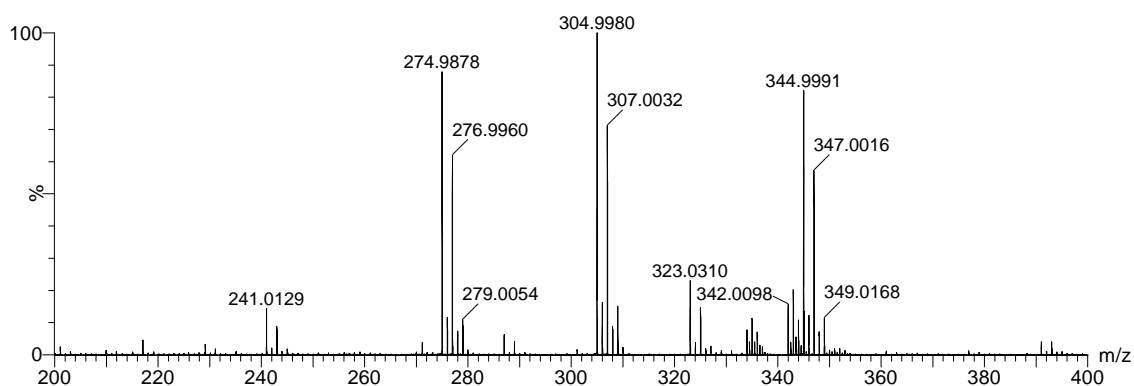


Figura 26. Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI positivo obtido pelo método desenvolvido.

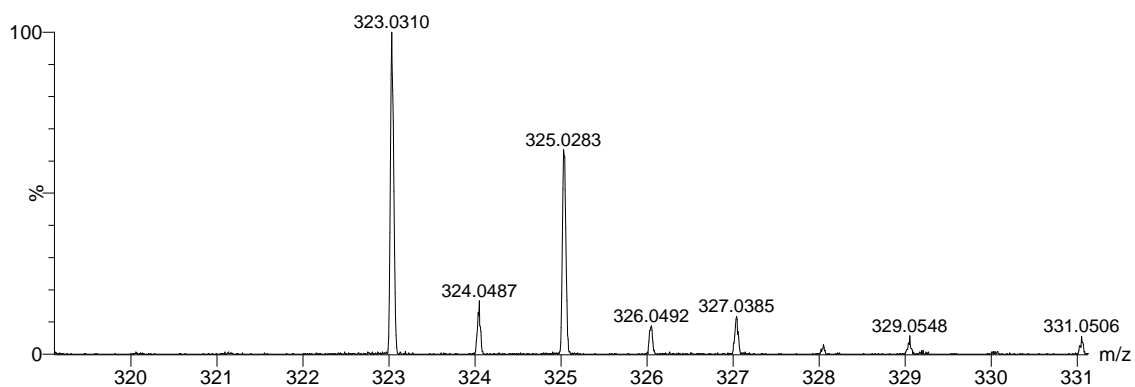


Figura 27. Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI positivo. Região do “cluster” da molécula protonada.

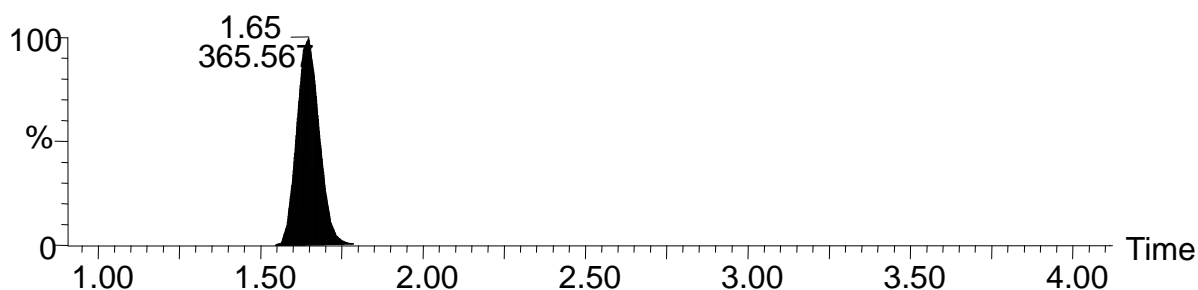


Figura 28. CIE do cloranfenicol protonado $[M + H]^+$ mostrando a área do pico de m/z 323 com concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na amostra.

Já operando em modo negativo o espectro de massas do cloranfenicol apresentou apenas um aglomerado de íons (Figura 29), representando a molécula desprotonada. Os principais íons foram m/z 321, 323, 325 e 327, e dois deles (321 e 323) foram os mais intensos no espectro. O mesmo padrão isotópico que caracteriza a presença de dois cloros foi observado no modo negativo. Os outros picos do espectro, que identificam os fragmentos não contém “clusteres”, devido à perda sequencial dos átomos de cloro. A perda de um fragmento contendo um dos cloros originou o m/z 257 e o m/z 259 ($[M - H - \text{CHClO}]^-$ na proporção 3:1, condizente com o espectro de massas de um íon com apenas um cloro. Já a perda de um fragmento contendo os dois cloros gera o íon de m/z 194 que não apresenta padrão isotópico de presença de cloro.

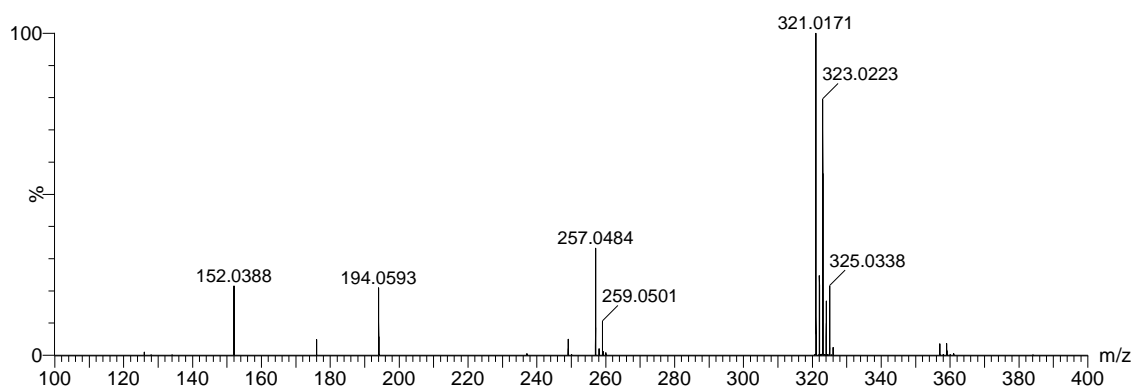


Figura 29. Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI negativo obtido pelo método desenvolvido.

Na Figura 30 pode-se visualizar bem o padrão isotópico que caracteriza o cloranfenicol com seus dois átomos de cloro no modo ESI negativo.

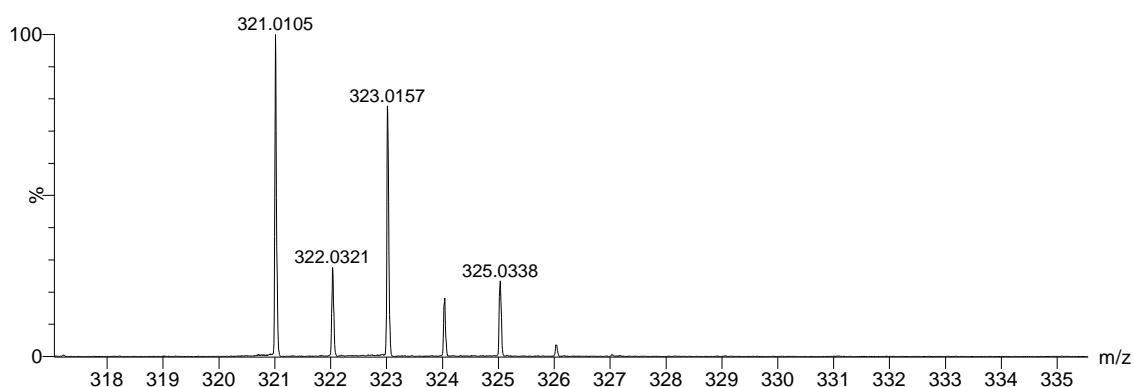


Figura 30. Espectro de massas do cloranfenicol no modo ESI negativo região do “cluster” da molécula desprotonada.

O CIE do íon de m/z 321 apresentou um pico com a área de 1395,082 (Figura 31), bem maior em comparação com o íon equivalente do modo de ionização positivo, o m/z 323. Isso representa um ganho em sensibilidade de cerca de quatro vezes, o que permite trabalhar com soluções mais diluídas.

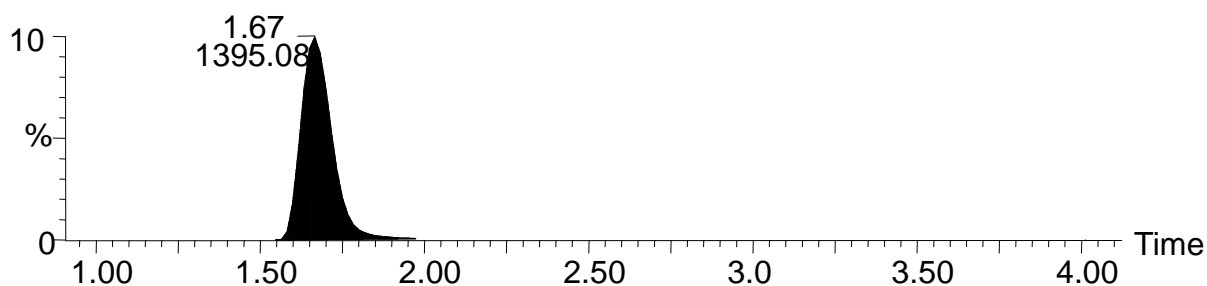


Figura 31. CIE do cloranfenicol desprotonado $[M - H]^-$ mostrando a área do pico de m/z 321 com concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na amostra.

A formação dos três íons pela adição de próton, sódio e potássio ($[M + 1]^+$, $[M + 23]^+$ e $[M + 39]^+$, respectivamente) no modo ESI positivo justifica a área de pico inferior da molécula protonada em comparação com a área da molécula desprotonada em modo ESI negativo. No modo negativo não houve a formação de adutos.

A Figura 32 mostra proposta para formação dos principais íons no ESI positivo.

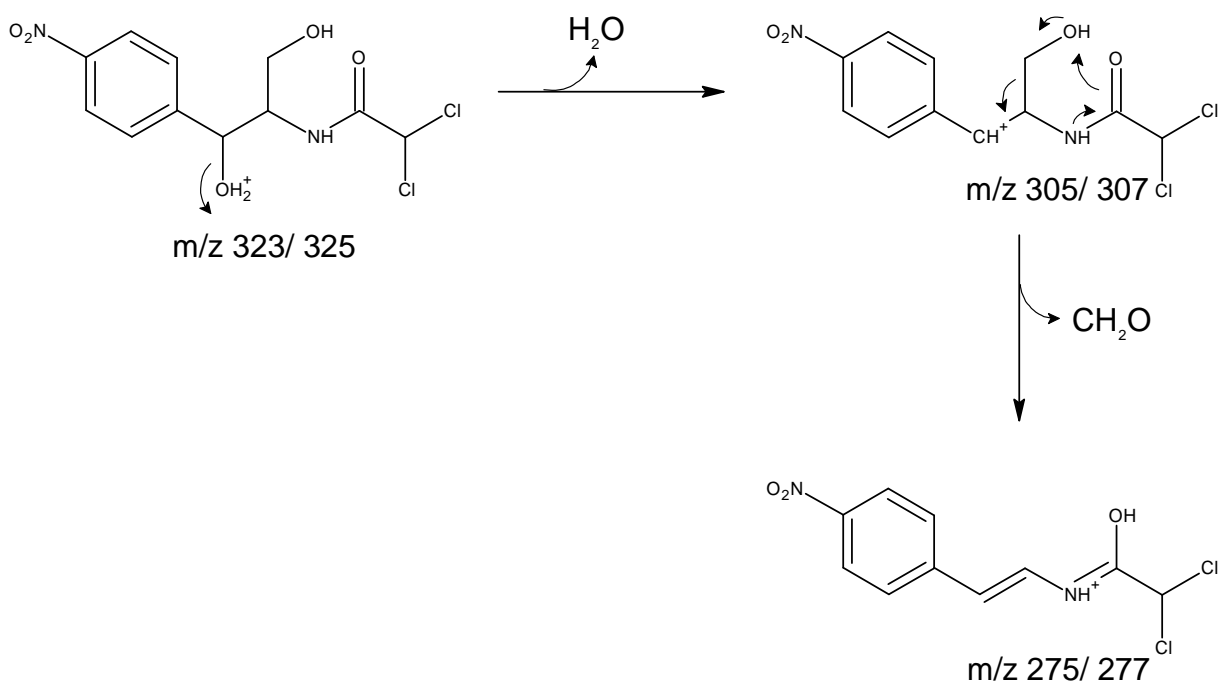


Figura 32. Proposta de formação dos íons fragmentos do cloranfenicol no modo ESI positivo.

Já a Figura 33 mostra proposta para formação dos principais íons no ESI negativo.

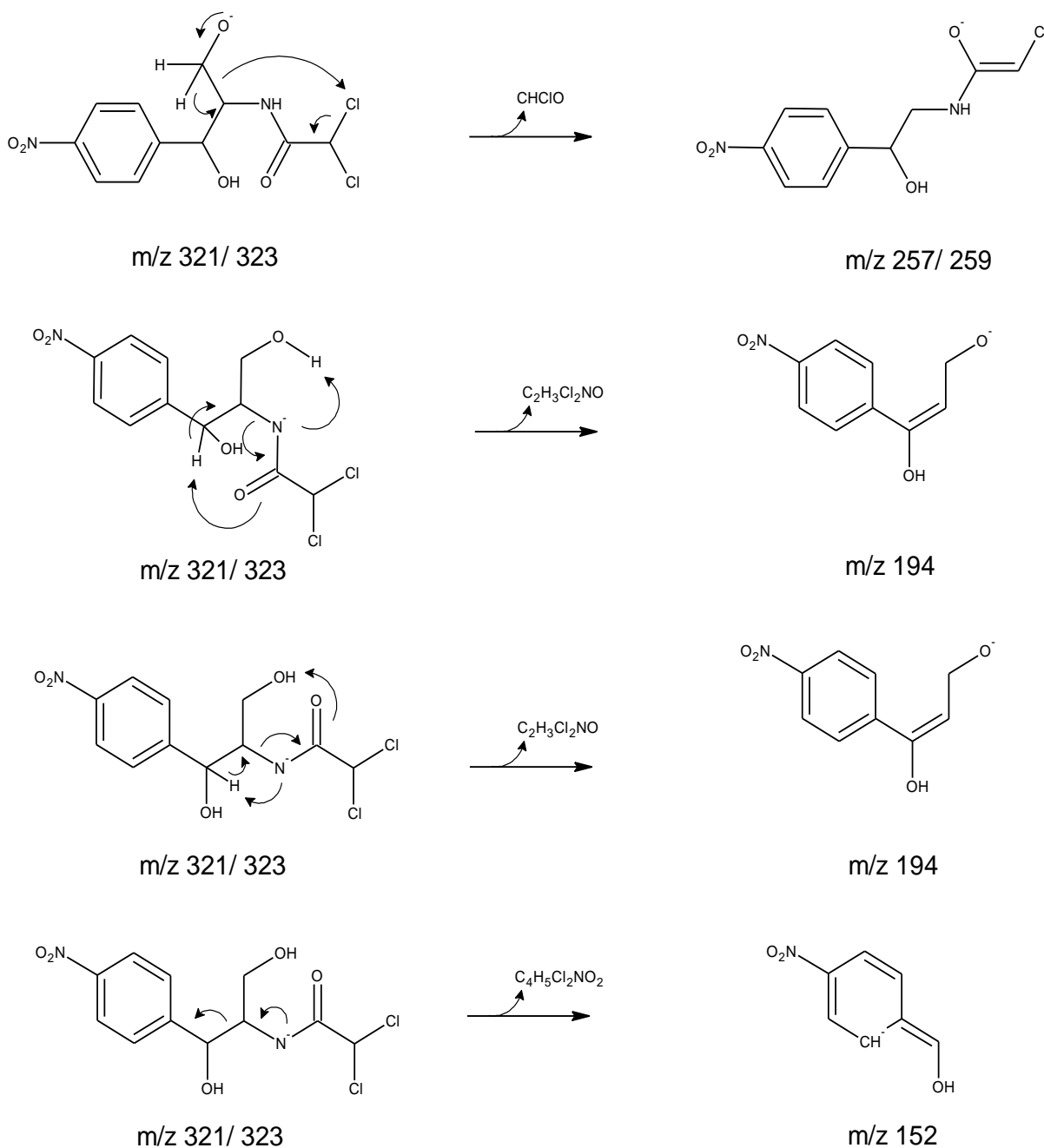


Figura 33. Proposta de formação dos íons fragmentos do cloranfenicol no modo ESI negativo.

Diante destes resultados foi desenvolvido um método cromatográfico que maximizasse a sensibilidade no modo negativo, cujos parâmetros cromatográficos

são: fluxo 0,2 mL/min, fase móvel H₂O:MeOH 70:30 com 10 mM de formiato de amônio. Foi utilizada uma coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 50 X 2,1 mm, 1,7 µm, 40 °C e volume de injeção 2 µL.

O método apresentou bom limite de detecção, 0,1 µg/kg, suficiente para detectar pequenas quantidades do contaminante. Esse limite foi estimado através de sucessivas análises da matriz isenta de analito, adicionada de padrão até que o sinal do analito não pudesse mais ser observado. Devido a sua toxicidade seu uso deve ser restringido ao máximo, limitando-se a pacientes graves em que o uso de outros antibióticos não surtiu efeito. O seu limite de referência no Brasil em alimentos é de 0,3 µg/kg, sendo que os métodos utilizados devem alcançar esse valor (BRASIL, 2013 e BRASIL, 2003).

O TOF não é um detector tão sensível quanto o QqQ, entretanto, no caso do cloranfenicol, foi possível alcançar o limite estabelecido pela legislação, pois o método de extração utilizando solvente orgânico permite uma fácil concentração através da evaporação do extrato e ressuspendendo em volume menor, que associado à um bom método de separação permite concentrar e eliminar interferentes que desfavoreceriam a detecção.

Ambos os solventes testados para extração, ACN e acetato de etila obtiveram bom desempenho analítico. Apesar de muitos métodos utilizarem o acetato de etila, optou-se por utilizar a ACN por ser um solvente com menor contagem de sinais no espectro de massas. Entretanto, para algumas amostras de mel não havia total separação das fases (ACN para extração e água para solubilização da amostra) quando se utilizava apenas o solvente e a amostra solubilizada. Para estimular a separação das fases foi adicionado KCl em uma proporção de 50 % (m/m) da amostra no momento em que foi adicionado o solvente para extração. Com isso sempre se obteve separação de três fases: sal precipitado no fundo, solução aquosa no meio, e o sobrenadante ACN contendo o cloranfenicol.

Comparando-se os resultados com o dos métodos citados anteriormente (Tabela 2) Percebe-se que a utilização do CLUE agilizou bastante a análise. Quando se compara o método desenvolvido com o de Júnior e outros (2006) que utiliza QqQ, houve um ganho de tempo de 12,5 minutos, o que representa uma economia de 86 %. Mesmo quando se compara com o método de Kaufmann e outros (2007) que também utilizaram CLUE-TOF, houve redução no tempo de análise e no consumo de solventes, como mostra a Tabela 11, 78 % e 85 %, respectivamente. Entretanto,

o método de Kaufmann e outros é multirresíduo, que acaba acrescentando mais tempo à análise.

5.3.3 Melamina

A contaminação por melamina em alimentos não gera preocupações apenas por causa da fraude. A melamina quando presente no sistema urinário juntamente com o ácido cianúrico precipita, gerando cálculos que podem levar à falência renal aguda. Novos dados indicam que a presença de apenas melamina na urina está associada ao aumento da incidência de litíase renal por cálcio e ácido úrico a longo prazo (LÓPEZ; QUEREDA, 2011). Por isso é cada vez maior a importância de métodos rápidos que possibilitem análise de muitas amostras em curto espaço de tempo.

O método desenvolvido simplifica bastante a análise, principalmente na etapa de extração que é bastante rápida, além de agilizar a separação e identificação através do uso otimizado do CLUE-TOF.

Os parâmetros de fonte encontrados para a análise de melamina estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros de fonte encontrados para análise de melamina.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	0,9
Cone	23
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	400
Fluxo desolvatação (L/h)	500

Foi desenvolvido um método cromatográfico isocrático para melamina, utilizando como fase móvel uma solução MeOH:água, 80:20 contendo 0,1 % de ácido fórmico (v/v/v). Foi utilizada coluna HILIC Kinetex, Phenomenex, 50 X 2,1 mm, 1,7 µm, com fluxo de 0,3 mL/min a 30 °C. O volume de injeção foi de 1 µL.

No desenvolvimento do método para detecção de melamina os melhores resultados foram obtidos em HILIC. A melamina, assim como a histamina, é uma molécula pequena, altamente hidrofílica, sendo que a melamina, tem ainda mais nitrogênios do que a histamina (Figura 34). Isso faz com que a sua retenção em

cromatografia RP seja muito baixa, o que se mostrou insuficiente para separar o analito dos interferentes, levando a uma alta supressão de ionização.

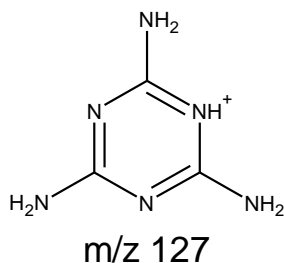


Figura 34. Estrutura da melamina protonada, forma detectável no CLUE-TOF.

Além do problema da baixa retenção em cromatografia RP, a análise de substâncias nitrogenadas tende a ser difícil devido à sua ionização, que fica em equilíbrio com a forma não ionizada, levando ao alargamento do pico e formação de cauda.

Observou-se que no método desenvolvido, houve apenas um pequeno alargamento da banda, mesmo utilizando-se como fase móvel um solvente a princípio não recomendado para HILIC, o metanol. Quando se utiliza solventes polares em HILIC como o MeOH, a tendência é que haja um alargamento do pico pois o solvente compete com a fase estacionária e vai arrastando o analito. O ideal quando se utiliza HILIC é que a injeção da amostra seja feita em solvente orgânico menos polar, como a ACN e a fase móvel tenha eluição com água como solvente polar misturado à ACN. Este trabalho utilizou o máximo possível o MeOH, pois é solvente de menor custo e toxicidade mais baixa em relação à ACN, e mostrou que atualmente é possível se fazer análises HILIC com MeOH, entretanto, a injeção da amostra foi realizada com esta solubilizada em ACN.

Durante a extração, assim como ocorreu com as amostras de mel, algumas vezes a separação de fases não ocorria. Isso provavelmente ocorreu pela diferença na quantidade de íons e proteínas das diferentes amostras trabalhadas. Para acelerar esse processo de separação de fases foi acrescentado KCl em uma proporção de 50 % (p/p) da amostra. Esse procedimento força a separação das fases pela diminuição da solubilidade da ACN em água devido à saturação da fase aquosa com sal ("salting out").

A Figura 35 mostra os sinais obtidos para melamina, e a Figura 36, mostra o CIE do íon m/z 127, referente a melamina protonada $[M + H]^+$.

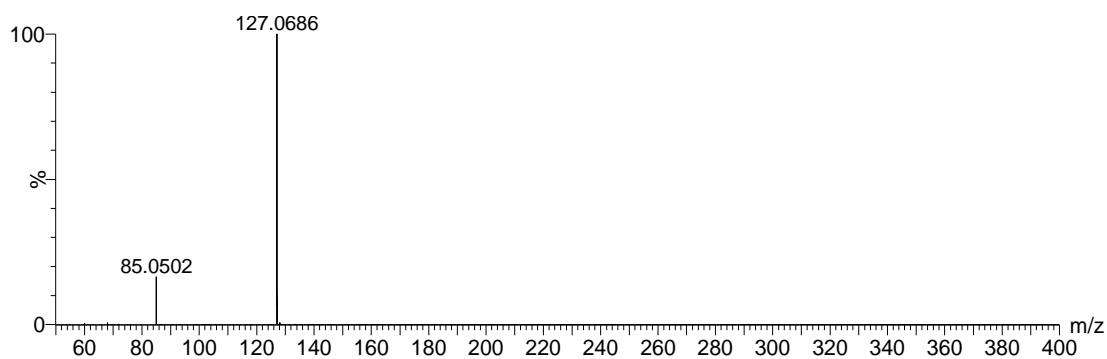


Figura 35. Espectro de massas da melamina pelo método desenvolvido.

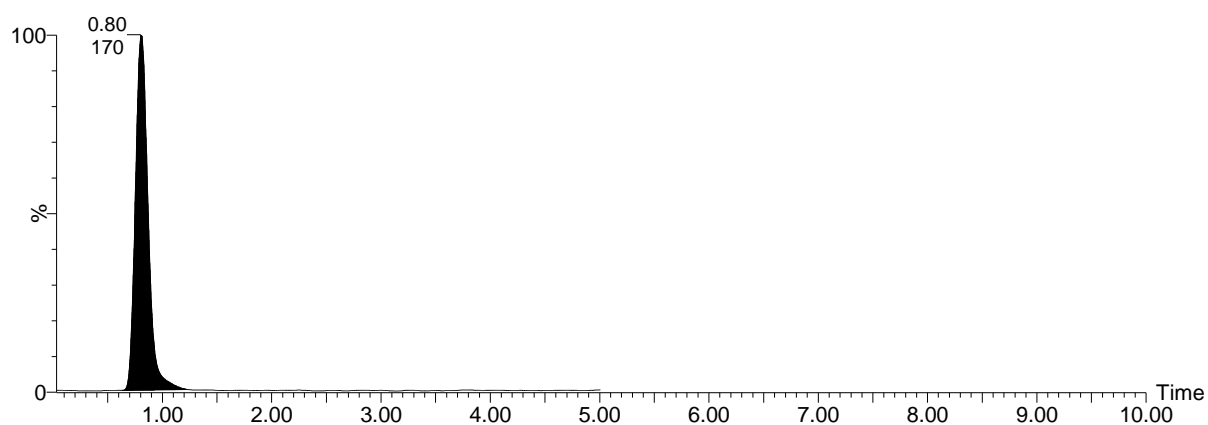


Figura 36. CIE do íon m/z 127, molécula da melamina protonada $[M + H]^+$.

Não se observa neste espectro a fragmentação característica de aminas no ESI positivo que é a perda de amônia, $[M + H - NH_3]^+$, 17 Da. Entretanto, observa-se a perda de 42 Da, que equivale à fragmentação $[M + H - CH_2N_2]^+$, segundo proposta de fragmentação (Figura 37).

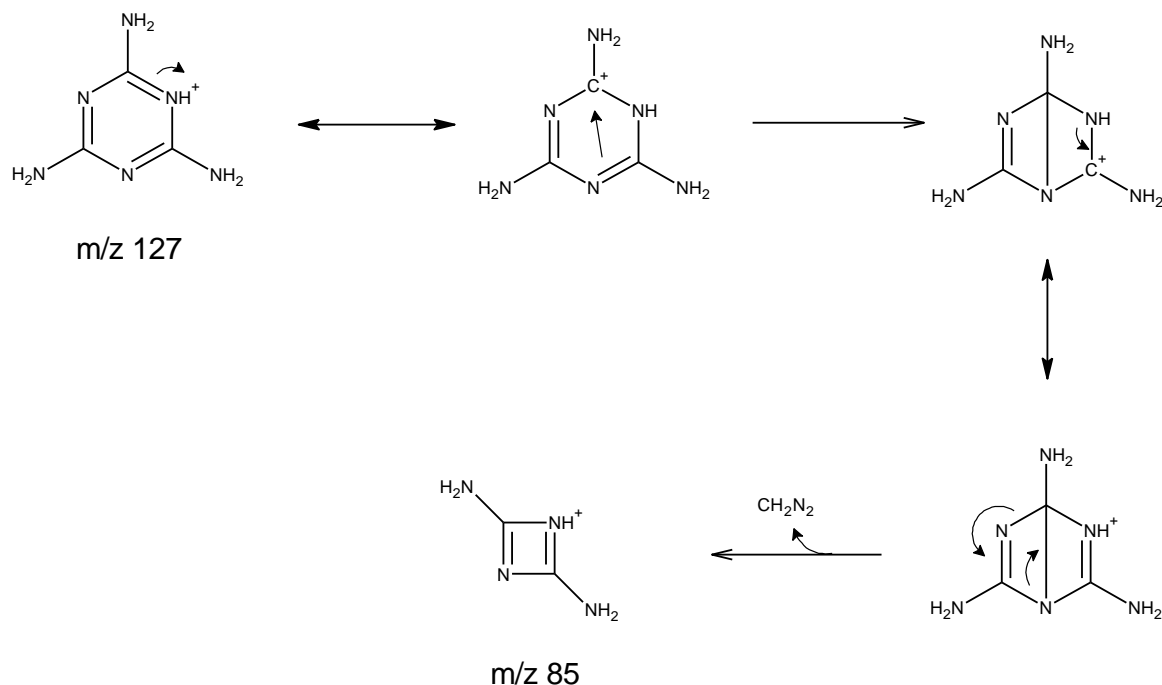


Figura 37. Proposta de fragmentação para a perda de 42 Da pela melamina protonada.

A proposta acima condiz com a de Vail, Jones e Sparkman (2007) que trabalharam com análise de melamina por TOF com massa exata por injeção direta. Em seu trabalho os autores afirmam que a exatidão da massa varia com a concentração. Neste trabalho observou-se uma grande variação da exatidão durante a corrida cromatográfica e com a temperatura da sala onde fica o equipamento.

Segundo a ANVISA, o laudo da análise de melamina comprovando a sua ausência deve vir acompanhado do limite de detecção do método (BRASIL, 2008). Portanto, o método desenvolvido tem sensibilidade suficiente para detectar baixos níveis de contaminação, sendo que para fraudes dificilmente se utiliza quantidades tão pequenas de um adulterante.

Comparando-se o método deste trabalho com o de Cheng e outros (2009), percebe-se que apesar de o método de Cheng ser bem rápido não há aproveitamento de todo o potencial do CLUE-EM/EM, pois mesmo com a utilização de SPE para purificação do extrato o método ainda leva o dobro do tempo do método desenvolvido neste trabalho, 4 minutos. Já Xu e outros (2010) utilizam uma extração com resina contendo óxido de ferro, que se liga à melamina e depois é separada da matriz utilizando um campo magnético. Após essa etapa a melamina

deve ser eluída da resina antes da injeção no cromatógrafo para análise por CLAE-EM/EM. O método deste trabalho apresentou o mesmo desempenho do de Xu e outros, mas em um tempo cinco vezes menor (2,0 minutos) e com gasto de solvente 94 % menor e sem a necessidade de se utilizar resina para extração.

5.3.4 Tetraciclina

Resíduo de um medicamento veterinário é uma designação dada a uma fração de um fármaco, um metabólito, ou uma porção não metabolizada, utilizado no tratamento veterinário. A tetraciclina é um agente antimicrobiano de largo espectro bastante utilizado no tratamento de gado de leite. Concentrações relativamente elevadas de tetraciclina são secretadas no leite, assim, deve ser observado um período de espera em que o leite de um animal que foi tratado não deve ser consumido.

Seu uso em gado se dá para a prevenção ou tratamento de doenças da glândula mamária e do aparelho reprodutivo. Uma contaminação no leite com resíduos deste antibiótico pode produzir resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas em humanos e também reações alérgicas e de hipersensibilidade (YU et al., 2011). Estes antibióticos no leite também podem ainda causar problemas com processo de fermentação em indústrias de laticínios.

Os Parâmetros cromatográficos do método desenvolvido se encontram na Tabela 15.

Tabela 15. Parâmetros cromatográficos otimizados encontrados para análise de tetraciclina por CLUE-TOF.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B	Curva
Inicial	0,3	95	5	Inicial
0,5	0,3	95	5	6
2	0,3	50	50	6
3	0,3	95	5	6

Foi utilizada coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 50 X 2,1 mm, 1,7 µm, em forno a 30 °C. Volume de injeção 1 µL e como fase móvel solução de ácido fórmico 1 % (v/v), fase A e fase B solução água: MeOH (1:1, v/v).

Os parâmetros ótimos de fonte encontrados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros ótimos de fonte encontrados para análise de tetraciclina por CLUE-TOF.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	2,5
Cone	30
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	400
Fluxo desolvatação (L/h)	550

No método desenvolvido para CLUE com detecção por UV foi utilizada coluna Shim-pack XR ODS 3, Shimadzu, 200 X 2,0 mm, 2,2 μ m, a 40 °C, com volume de injeção de 1 μ L, sendo a fase móvel A, solução de 0,5 % de ácido fórmico (v/v) e a fase B MeOH. A detecção foi feita em 267 nm, de acordo com o máximo de absorção obtido no espectro de UV/VIS (Figura 38).

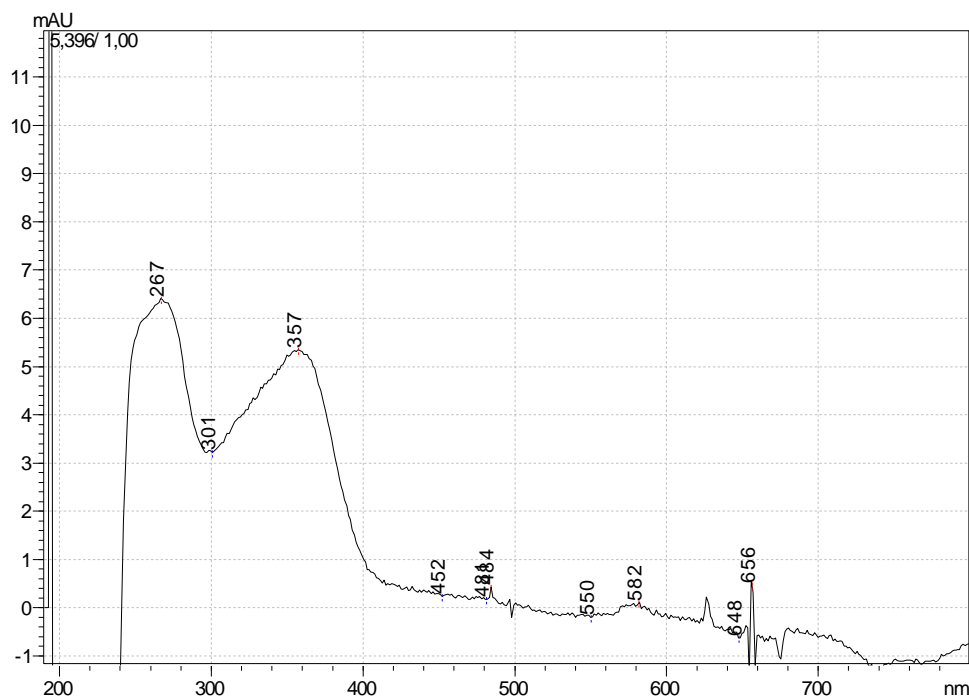


Figura 38. Espectro de UV/ VIS da tetraciclina.

Os parâmetros de gradiente do método desenvolvido para o CLUE com detecção por UV se encontram na Tabela 17.

Tabela 17. Gradiente desenvolvido para análise de tetraciclina por CLUE com detecção por UV.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B	Curva
Inicial	0,3	90	10	Inicial
1,5	0,3	90	10	6
5	0,3	40	60	6
8	0,3	40	60	6
8,5	0,3	90	10	6

O método de extração utilizado teve sua recuperação testada e se mostrou efetivo na concentração de 100 ng/mL, limite estabelecido pela legislação. (BRASIL, 2013; ZILIOTTO et al., 2011; BRASIL, 2003).

A extração foi adaptada para se evitar o uso de ácidos e aditivos que pudessem danificar o TOF ou causar supressão de ionização como ácido oxálico, TFA e EDTA. Para a separação das fases também foi utilizado o recurso da adição de KCl como feito nos outros métodos.

O método de CLUE-TOF apresentou sensibilidade superior ao CLUE com detecção por UV. O limite de quantificação para o UV foi de 80 ng/mL (Figura 39), sendo que no primeiro sistema pode-se construir uma curva analítica cuja faixa de trabalho foi 12,5 a 100 ng/mL (Figura 40).

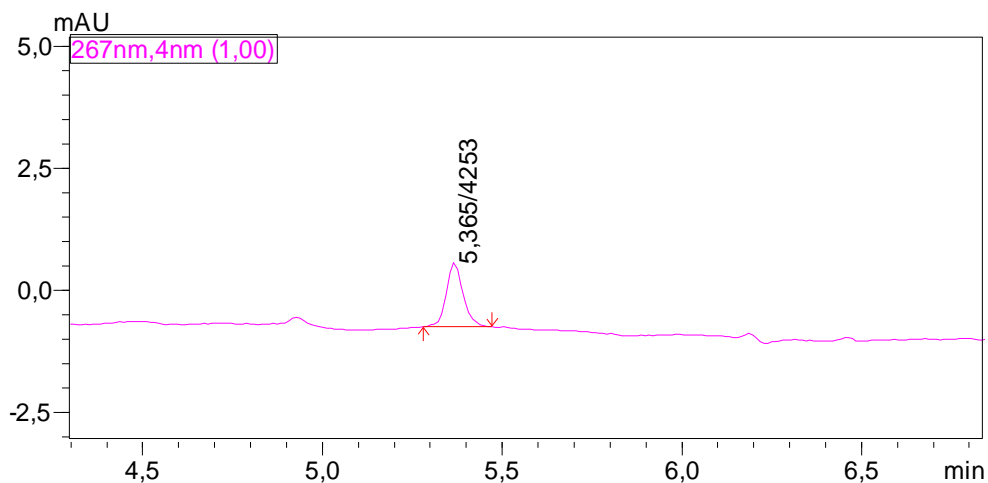


Figura 39. Cromatograma da tetraciclina obtido por CLUE com detecção por UV no limite de quantificação, 80 ng/mL.

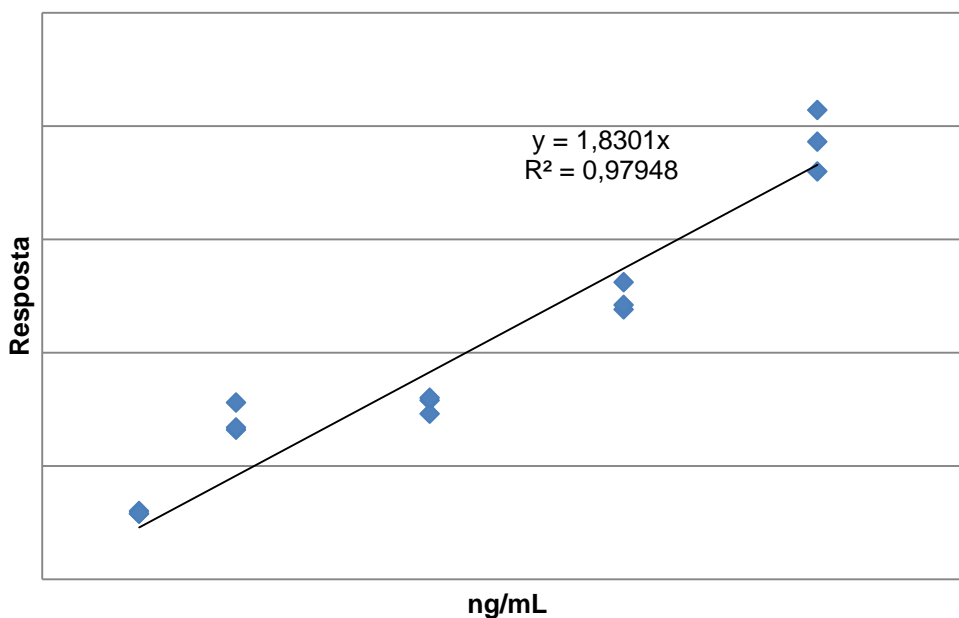


Figura 40. Curva analítica para análise de tetraciclina por CLUE-TOF.

A avaliação da qualidade da regressão linear demonstrou que os dados são homocedásticos – Cochran calculado $0,6450 <$ que o tabelado $0,6838$. Os resíduos possuem distribuição normal – p $0,41$ para os testes de Anderson-Darling e p $0,31$ para o teste de Shapiro-Wilk. A regressão é significativa – p $3,24 \times 10^{-13}$ -, mas há uma considerável falta de ajuste – p $0,0003$.

Esses dados indicam que o equipamento consegue fornecer resultados reprodutíveis mesmo nessa faixa de trabalho, que é bem menor que a da histamina, mas nesse caso há falta de ajuste. A falta de ajuste ocorre quando os pontos da curva analítica não se ajustam sobre a reta originada na regressão, levando a um erro na exatidão do método. Mesmo assim, existem limites para o erro na exatidão, que para essa faixa de trabalho é aceitável entre -20 % e +10 %, aceitando-se inclusive a correção desses valores (CE, 2002). Essa falta de ajuste pode ser também a razão do R^2 relativamente baixo 0,97948, entretanto, o INMETRO afirma que a linearidade pode ser avaliada também por ANOVA e não estabelece mais valor mínimo para este coeficiente (BRASIL, 2010).

Na análise por CLUE-TOF pode-se observar no espectro de massas (Figura 41) a molécula protonada, m/z 445, a perda de água pela molécula protonada, m/z 427 ($[M + H - 18]^+$) e, em seguida, a perda de amônia m/z 410 ($[M + H - 18 - 17]^+$).

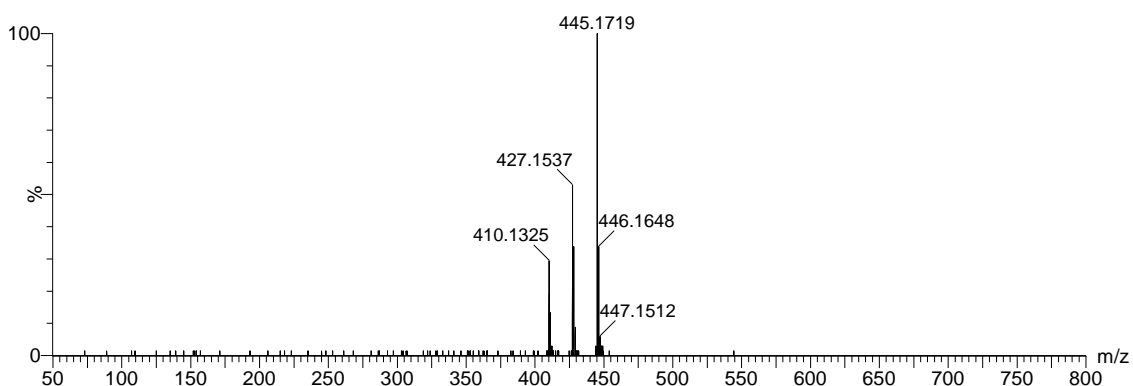


Figura 41. Espectro de massas da tetraciclina pelo método desenvolvido por CLUE-TOF.

Uma proposta para essas fragmentações é apresentada na Figura 42.

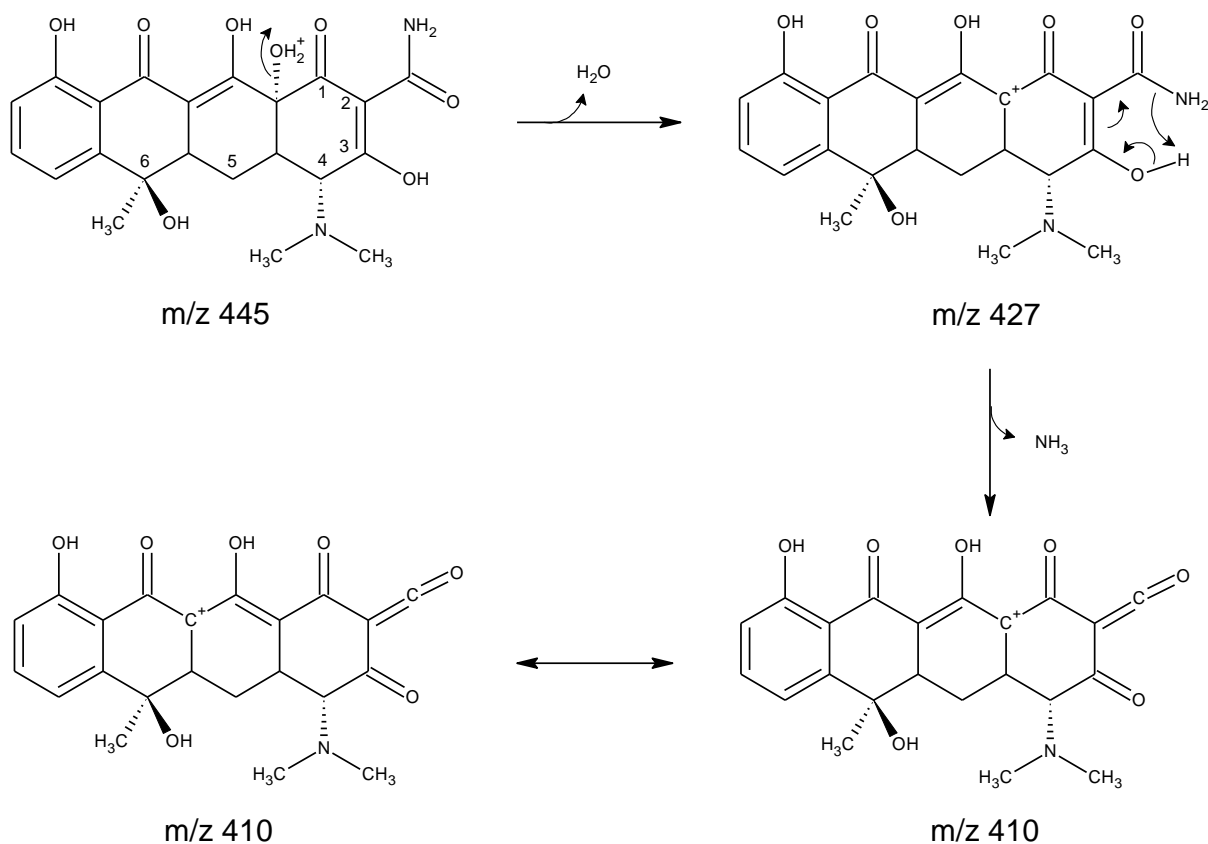


Figura 42. Proposta de fragmentação da tetraciclina em ESI positivo.

Avaliando-se o CIE do íon m/z 445 (Figura 43), observa-se a presença de um isômero da tetraciclina, com pequena intensidade. Na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ o sinal ficou em cerca de 2 % do pico principal.

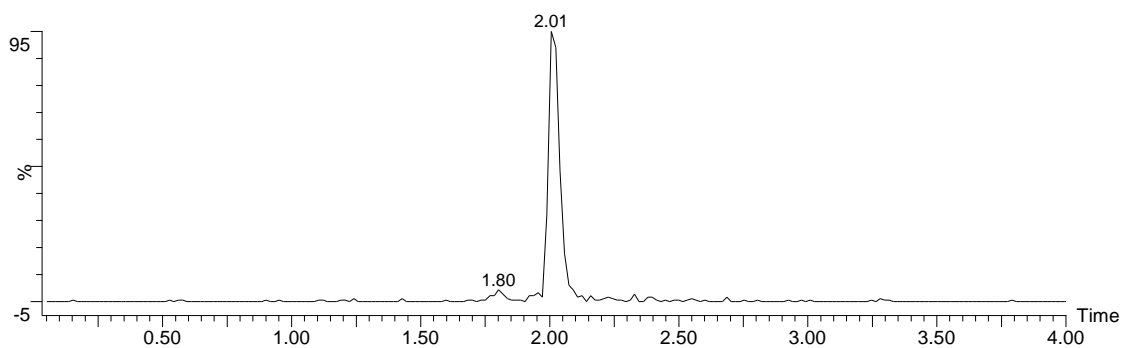


Figura 43. CIE da tetraciclina protonada, obtido pelo método desenvolvido por CLUE-TOF. Observam-se os sinais da tetraciclina t_R 2,01 minutos e do seu epímero t_R 1,80 minutos.

A presença desse isômero também foi observada na análise feita por CLUE e detecção por UV (Figura 44), entretanto, pela técnica de EM pode-se avaliar adequadamente o sinal verificando que se trata de substância com mesma fórmula molecular, pois os picos apresentam espectros de massa iguais.

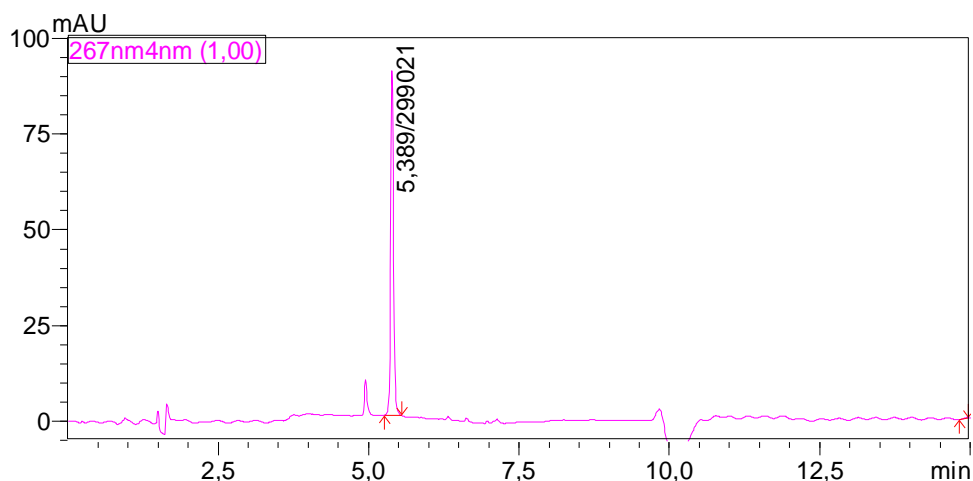


Figura 44. Cromatograma da tetraciclina obtido por CLUE/UV 8 µg/mL.

Esses dados indicam que esse isômero parece ser um dos produtos de degradação da tetraciclina, que é a epitetraciclina. A mudança de configuração do carbono 4 (Figura 42) da tetraciclina ocorre comumente, assim como a sua desidratação, formando a anidrotetraciclina e a epianidrotetraciclina, que não foram observados no padrão utilizado.

Além da tetraciclina, que tem seus níveis máximos em alimentos estabelecidos por legislação, é importante também avaliar a presença dos produtos de degradação no alimento, tendo em vista que além das implicações na saúde oriundas da resistência de bactérias ao antibiótico, associada ao consumo indevido deste através da alimentação, a anidrotetraciclina é extremamente tóxica, podendo levar à morte.

A desidratação da tetraciclina é mais favorável para a epitetraciclina, sendo que este isômero favorece a formação do produto tóxico (PENA et al., 1998). Segundo os mesmos autores, a tetraciclina é utilizada também como aditivo em rações de uso animal para promover o ganho de peso, e nestes casos, se utiliza um antibiótico de qualidade mais baixa, sendo que as condições de umidade e temperatura em que geralmente são armazenadas essas rações, favorecem a

degradação da substância, havendo grandes chances de se haver transferência para o leite não só do antibiótico original, mas também do seu derivado tóxico.

Apesar de não terem sido detectadas a anidrotetraciclina e a epianidrotetraciclina, o método se mostrou capaz de diferenciar isômeros, o que mostra seu grande potencial de separação.

Comparando-se o método desenvolvido com o de Xu e outros (2008), percebe-se que houve economia de tempo e de solventes 69 e 63 %, respectivamente. Houve também economia no preparo da amostra, pois o método desenvolvido dispensa a SPE, e mostrou também ser possível realizar a extração evitando-se a utilização do TFA, que causa enorme supressão de ionização e conseqüentemente diminuição na sensibilidade do método. Provavelmente o método de XU não pode dispensar a SPE devido à utilização do TFA na extração. O EDTA, que outros autores utilizam também foi dispensado.

5.3.5 Análise de histamina em vinho

A ocorrência de amins biogênicas em vinhos é bem documentada e uma grande variação nas concentrações dessas substâncias é relatada. A presença destes contaminantes resulta da atividade de enzimas amino ácido descarboxilase de microorganismos, que podem ser os responsáveis pelo processo de fermentação ou aqueles relacionados à contaminação ou deterioração (HALA'SZ et al., 1994). A variabilidade no conteúdo de amins biogênicas de vinho pode ser explicada com base em diferenças nos processos de vinificação, tempo e condições de armazenamento, a qualidade de matérias primas, e possível contaminação microbiana durante as operações de adega (VIDAL-CAROU; MARINE-FONT; CODONY-SALCEDO, 1990).

Os limites tóxicos de ingestão para histamina são aproximadamente: 8-40 mg, intoxicação leve; 40-100 mg, intoxicação intermediária, mais de 100 mg, intoxicação intensiva. Por esta razão, alguns países, como os Estados Unidos da América, Alemanha, Bélgica, França, Suíça, Suécia e Holanda, têm regulamentos e exigências legais para os limites máximos de histamina em vários alimentos. A falta de legislação no país sobre o conteúdo máximo de histamina no vinho torna difícil para o Brasil exportar esse produto (ANLI et al., 2004).

A determinação de histamina não é simples, justamente devido a sua estrutura. Por ser altamente polar dificulta a separação por cromatografia RP em matrizes complexas como o vinho, além de apresentar baixa absorvância de luz UV/VIS, dificultando a detecção. A CLAE é a técnica mais amplamente utilizada devido à sua alta resolução, a sensibilidade, grande versatilidade. Entretanto, utiliza-se derivatização pré ou pós coluna para potencializar a separação por RP, diminuindo a polaridade da molécula, e aumentar a sensibilidade para detecção (SCHULZ, 2009).

A análise de histamina em vinhos serve também como indicador de qualidade de todo o processo de produção da bebida.

Os parâmetros de fonte ótimos, obtidos, se encontram na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de fonte obtidos para análise de histamina em vinho.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	0,7
Cone	24
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	500
Fluxo desolvatação (L/h)	500

A Figura 45 mostra o espectro de massas do pico gerado pela histamina protonada, obtido por injeção cromatográfica.

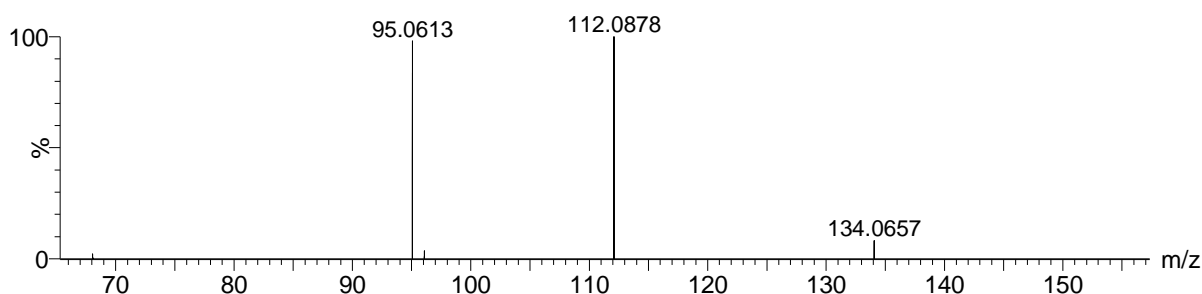


Figura 45. Espectro de massas da histamina obtido pelo método desenvolvido. $[M + H]^+$, m/z 112 e $[M + H - NH_3]^+$, m/z 95.

A otimização foi executada de forma a se obter o maior sinal para o m/z 112. A presença do íon de m/z 95 é constante no espectro da histamina por ESI no equipamento utilizado demonstrando que mesmo com uma ionização de baixa energia a molécula de histamina protonada é suficientemente instável nas condições internas do equipamento para se fragmentar espontaneamente, originando o fragmento $[M + H - NH_3]^+$. A estrutura da histamina está representada na Figura 46.

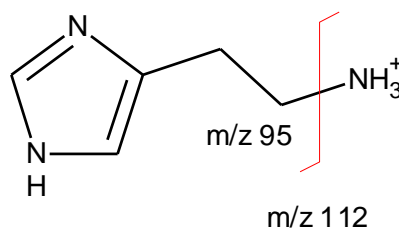


Figura 46. Estrutura da histamina protonada $[M + H]^+$ indicando a posição onde ocorre a quebra da ligação C-N para formar o íon $[M + H - NH_3]^+$, m/z 95.

O espectro em alta resolução, fornecido pelo TOF permite a visualização de interferentes com a mesma massa nominal e t_R da molécula protonada (Figura 47).

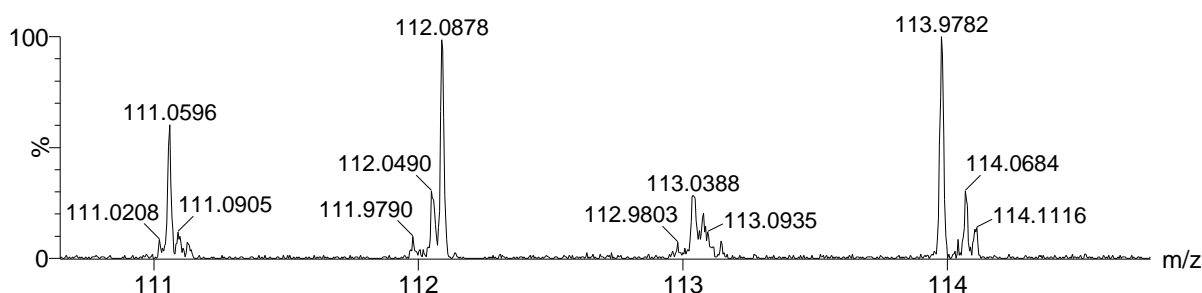


Figura 47. Espectro de massas de alta resolução de amostra de vinho adicionada de padrão de histamina mostrando picos de mesma massa nominal da histamina.

Apesar da intensidade desses outros sinais (m/z 112,0490 e m/z 111,9790) ser bem menor que o sinal do analito (m/z 112,0878) pode haver confusão e levar o analista a quantificar, ou mesmo identificar erroneamente o contaminante. Por isso, atualmente exige-se para uma identificação inequívoca que as análises de CLAE-EM (ou CLUE-EM) realizadas em QqQ apresentem pelo menos três íons para

caracterização, além do t_R . Já para análises que utilizam analisadores de alta resolução, a exigência é menor, apenas dois íons além do t_R (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013 e CE, 2002).

A Figura 48 mostra o CIE do padrão de histamina (I) adicionado à amostra de vinho tinto, e da histamina naturalmente presente na mesma amostra (II). Pode-se observar que na amostra, mesmo com a utilização do CIE, aparecem picos de interferentes. Nesses casos, uma boa separação cromatográfica é fundamental para a quantificação com máxima exatidão possível.

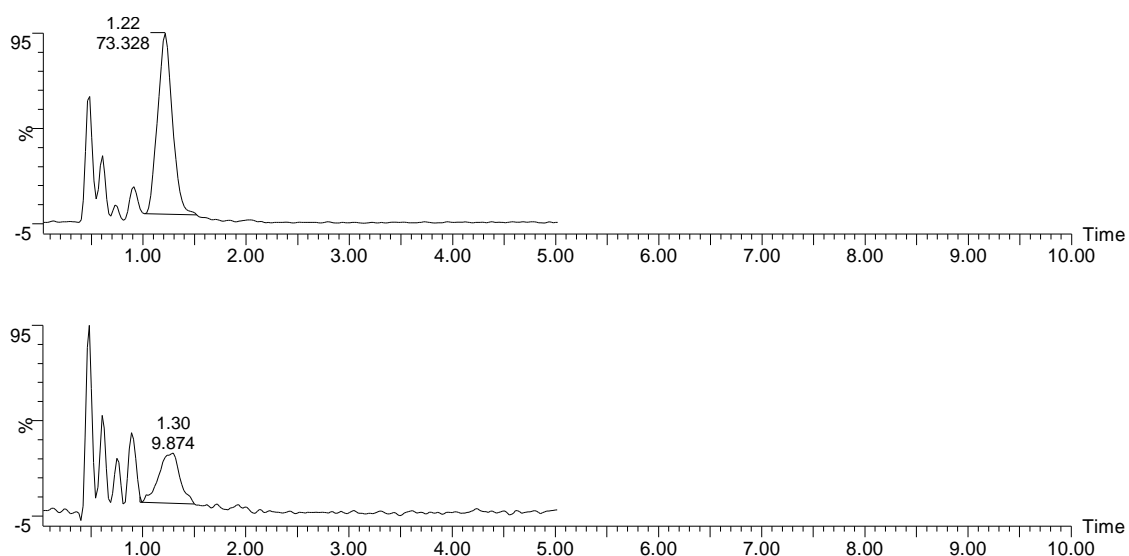


Figura 48. CIE da histamina protonada m/z 112 em amostra de vinho adicionada de padrão, I, e amostra de vinho naturalmente contaminada, II.

Em algumas amostras de vinho analisadas não se detectou histamina, de acordo com o cromatograma da Figura 49.

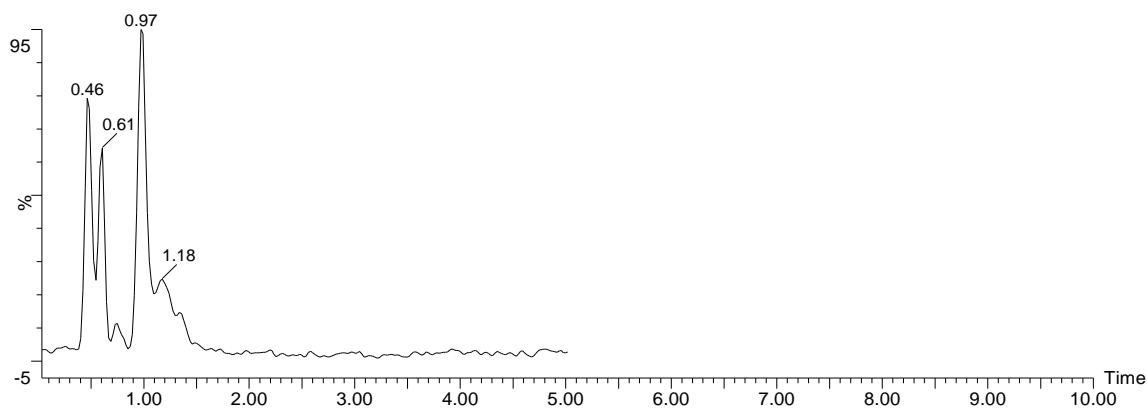


Figura 49. CIE de histamina protonada em amostra de vinho. Não foi detectada histamina nesta amostra.

A curva analítica do método e a confirmação do pico da histamina foram feitas através da adição de padrão em amostra em que não houve detecção da amina. Na amostra da Figura 49, após a adição de padrão, apenas o pico com t_R 1,22 min apresentou acréscimo de área, além de ser o único pico cujo espectro de massas apresentou o m/z 95, do fragmento $[M + H - NH_3]^+$.

5.3.5.1 desenvolvimento do método cromatográfico para análise de histamina em vinho

O desenvolvimento do método de quantificação de histamina em vinho foi iniciado nas colunas do tipo RP C18 de partículas totalmente porosas sub 2 μ m BEH Acquity. A retenção da molécula protonada foi muito baixa, sendo que nas colunas de 50 mm o analito eluía no t_M . Procurando-se aumentar a retenção, fez-se a associação de duas colunas em série, uma de 150 e outra de 50 mm. Essa medida também é eficaz para aumentar o número de pratos teóricos, entretanto, é mais comum de ser utilizada em colunas de fase monolítica, pois acarreta em grande aumento na pressão (FARIA et al., 2006; FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009) quando realizado com colunas empacotadas. Como o sistema CLUE suporta pressões de até 15000 psi, utilizando-se fluxos baixos não se extrapola esse valor.

Associando-se duas colunas a retenção da histamina protonada ainda foi muito baixa, mesmo utilizando-se a fase móvel mais fraca o possível, solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v). Utilizando-se a coluna XTerra nas mesmas condições o t_R e o n foram bem maiores, entretanto, quando se adicionou o analito à matriz, só foi possível observar o sinal da molécula protonada em altas concentrações, indicando uma grande supressão de ionização nessas condições (Figura 50).

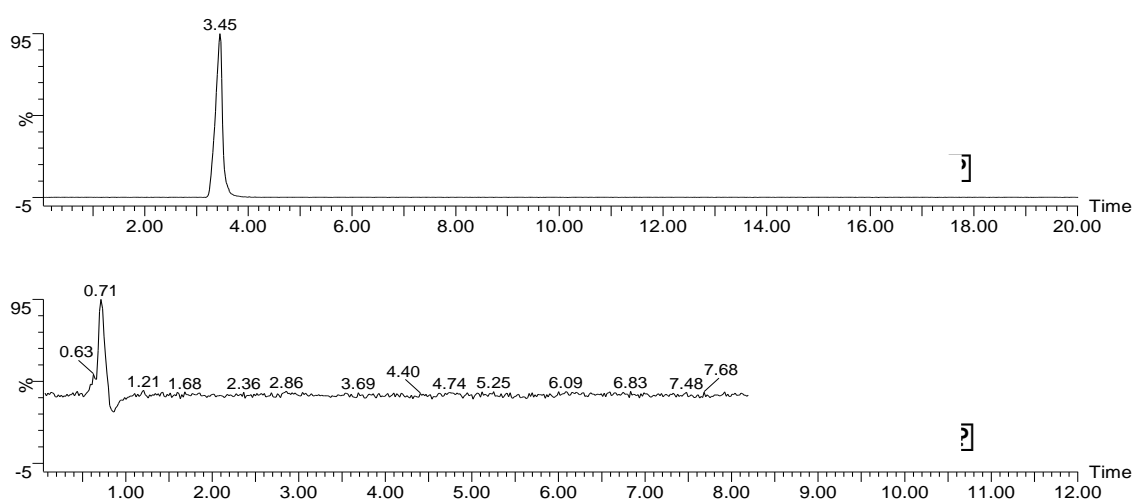


Figura 50. Sinal da histamina protonada na coluna XTerra, I e em duas colunas BEH ligadas em série II.

Nos dois casos mostrados a utilização da coluna RP C18, não resultou em redução efetiva do efeito de matriz, o que inviabiliza a análise.

A melhor forma de se detectar aminas por CLAE-EM com ionização por ESI é no modo positivo, adicionando-se um ácido volátil à fase móvel, sendo o ácido fórmico o mais utilizado. Entretanto, a histamina protonada é altamente hidrofílica apresentando pouca retenção em colunas com fase estacionária RP. De fato, pequenas moléculas básicas são de difícil análise por RP devido ao alargamento e deformação dos picos. Quando se utiliza CLAE nesses casos o ideal é adicionar uma base na fase móvel para impedir a ionização, diminuir a hidrofiliicidade e também o alargamento das bandas (SCHULZ, 2009). Essas medidas nem sempre funcionam em colunas RP, sendo necessário utilizar colunas altamente capeadas. No caso de se utilizar CLAE-EM, a inibição da ionização devido à utilização de base afetará drasticamente a sensibilidade do método. Além disso, a trietilamina, base mais utilizada nesses casos, é um forte supressor de ionização e se adsorve fortemente ao vidro sendo fonte de contaminação para o sistema.

A utilização de HILIC para esses casos é a melhor opção, pois a ionização, ao contrário da RP, aumenta a eficiência da separação (MCCALLEY, 2007) e a sensibilidade da detecção.

O n obtido para a coluna XTerra foi de 2600, já com a associação das duas colunas BEH o n foi de 400. Apesar da coluna XTerra ter o mesmo comprimento das duas colunas sub 2 μm associadas, a primeira possui diâmetro interno de 4,6 mm, comportando uma massa maior de fase estacionária. Aparentemente, no caso de analitos com pouca afinidade pela fase estacionária, quando há pouca interação devido à alta resistência à transferência de massa do analito da fase móvel para a fase estacionária, a vantagem tecnológica das colunas sub 2 μm não se reflete em maior eficiência devido ao baixo D_m , tornando-se mais vantajoso utilizar colunas convencionais nas análises.

A utilização da coluna HILIC ofereceu maior possibilidade de controle dos parâmetros cromatográficos, podendo-se otimizar o método. Através da cromatografia HILIC pode-se equilibrar o método para se obter uma análise ultra rápida e com grande sensibilidade. A maior seletividade para aminas da coluna HILIC foi aumentou a seletividade, separando melhor os interferentes e matriz da histamina. A grande desvantagem é a utilização maior de acetonitrila na fase móvel, solvente que apresenta toxidez e custo maior em relação aos outros três utilizados em todo esse trabalho. A rapidez da análise, todavia, compensa esse efeito, fazendo com que através da HILIC possa se fazer um número maior de análises em um menor tempo. De fato, a utilização da HILIC para moléculas pequenas, polares e altamente ionizáveis tem aumentado nos últimos anos, tendo a perspectiva de brevemente ultrapassar o uso da cromatografia RP nesses casos (ALPERT, 2011; KUMAR; HEATON; MCCALLEY, 2013)

O sistema apresentou pouca capacidade para a amostra. Volumes de injeção maiores que 1 μL geraram sobrecarga na coluna, deformando e alargando o pico da histamina e levando à uma variação no t_R , de acordo com a concentração do analito. Em geral colunas do tipo core-shell possuem pouca capacidade de amostra devido a pequena massa disponível para interação com os solutos em relação às colunas totalmente porosas. Além disso, a coluna utilizada, de apenas 2,1 mm de diâmetro interno possui a menor capacidade para amostra, justamente por comportar menos fase estacionária. Essa característica associada à melhor resposta das fontes ESI à concentração da solução e ao invés da massa do analito que chega à fonte (como

ocorre com fontes APCI) obriga à utilização de soluções mais concentradas da amostra.

Colunas HILIC de "sílica nua" não são boas opções para se trabalhar com amostras de matrizes complexas, pois estas podem conter substâncias que se adsorvem irreversivelmente à fase estacionária, como os carboidratos. Já colunas HILIC modificadas com ligantes polares, como grupos alquil, colesterol ou amino, oferecem seletividade mista, possuindo característica de fase RP, ou NP, dependendo da fase móvel utilizada - rica em água (RP), ou rica em solvente orgânico (NP) (JANDERA, 2011). Por outro lado, as colunas de "sílica nua" são as mais versáteis, e de menor custo.

A coluna HILIC utilizada neste trabalho possui ligantes amino e não apresentou mudanças significativas na R_S e na pressão de trabalho que indicassem adsorções irreversíveis.

Em colunas HILIC a injeção da amostra deve ser feita na maior concentração de solvente orgânico possível, para aumentar a transferência de massa dos analitos para a fase estacionária (JANDERA, 2011), que já é muito mais desfavorável nas colunas HILIC quando comparadas às colunas RP. Além disso, observou-se que a adição de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico à solução a ser injetada aumentou significativamente a sensibilidade do método.

O gradiente HILIC desenvolvido pode ser observado na Tabela 19. Foi utilizada coluna HILIC Kinetex, Phenomenex, 50 X 2,1 mm, 1,7 μ m, 30 °C. Fase A acetonitrila + 0,1 % de ácido fórmico (v:v) e Fase B solução de ácido fórmico 0,1 % (v:v). Volume de injeção 1 μ L.

Tabela 19. Gradiente HILIC desenvolvido para análise de histamina em vinho.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B	Curva
Inicial	0,3	60	40	Inicial
0,1	0,3	60	40	6
0,2	0,3	45	55	6
0,5	0,3	25	75	6
1,5	0,3	25	75	6
1,51	0,3	60	40	6

5.3.5.2 avaliação da curva analítica e seu potencial para quantificação

O método desenvolvido foi capaz de fornecer uma curva analítica para quantificar satisfatoriamente a histamina presente nas amostras de vinho analisadas. Isso demonstra que os TOF modernos, diferentemente dos antigos, possuem capacidade de quantificar analitos. Apesar disso, sua performance é bastante inferior à dos quadrupolos, que possuem sensibilidade, faixa linear de trabalho e repetitividade ainda muito superiores.

A avaliação da qualidade da regressão linear demonstrou que o modelo é adequado, homocedástico – Cochran calculado $0,5105 <$ que tabelado $0,6161$ -, produz resíduos com distribuição normal – $p > 0,06$ para os testes de Anderson-Darling e Shapiro-Wilk -, a regressão é significativa – $p > 1,14 \times 10^{-12}$ -, e não há falta de ajuste – $p > 0,17$. A Figura 51 mostra a curva analítica abrangendo uma faixa de trabalho de $0,525$ a $9,525 \mu\text{g/mL}$. O limite de detecção foi $0,46 \mu\text{g/mL}$. Estes valores cobrem os níveis máximos recomendados por diversos países europeus como Alemanha ($2 \mu\text{g/mL}$), Bélgica ($5\text{-}6 \text{ mg/mL}$), França (8 mg/mL) e Suíça (10 mg/mL) (LANDETE et al., 2005). Apesar da variação na repetitividade dos pontos da curva analítica estar dentro do aceitável estatisticamente, observa-se que há uma variação nesse parâmetro ao longo da curva, sendo que os valores centrais tiveram erro menor.

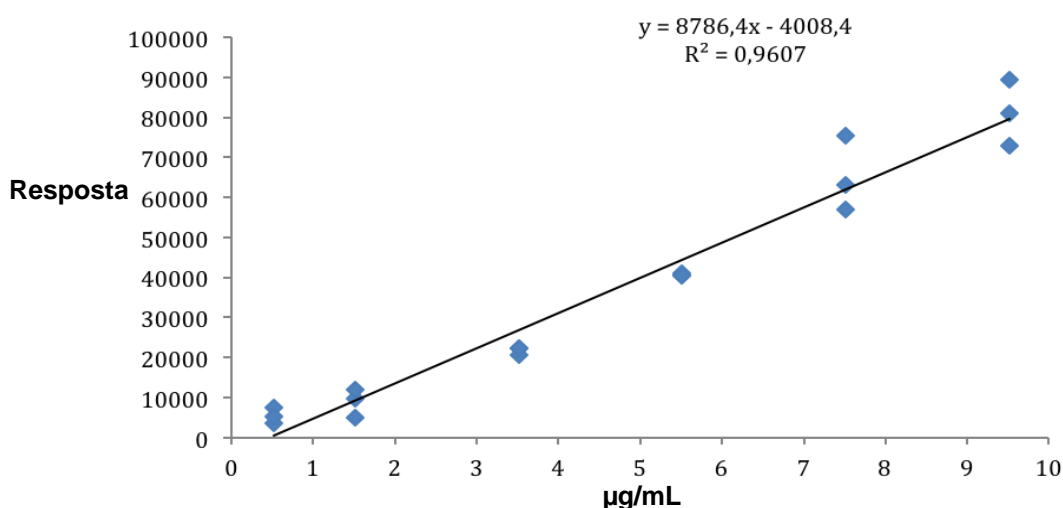


Figura 51. Curva analítica construída para análise de histamina em vinho.

A rapidez do teste permite que seja também utilizado como metodologia para acompanhamento da qualidade do vinho, que está diretamente relacionada com a quantidade de histamina, que normalmente é produzida em grandes quantidades devido quando as condições de higiene durante a produção são inadequadas (SOUZA et al., 2005). Apesar de já aparecerem na literatura métodos rápidos em HILIC CLAE-TOF (DANG, PESEK, MATYSKA, 2013), a utilização de métodos convencionais de HPLC-FD/UV-VIS ainda parece ser tendência (BENOIT et al., 2012; HERNÁNDEZ-CASSOU e SAURINA, 2011 e PEÑA-GALLEGO et al., 2009). O método desenvolvido, pela sua rapidez e curva analítica serve como método de “screening quantitativo” fornecendo resultados de alta confiabilidade pela alta resolução e exatidão de massa.

5.3.5.3 análise das amostras de vinho

Das treze amostras de vinho analisadas, em apenas três não se detectou histamina. Dez amostras apresentaram histamina em uma faixa que foi de 0,76 a 11,69 $\mu\text{g/mL}$ (valor estimado por estar acima do limite máximo da curva analítica). A maior parte das amostras se encontrou abaixo do limite médio (Bélgica) de 5 $\mu\text{g/mL}$ e apenas uma ultrapassou o limite suíço de 10 $\mu\text{g/mL}$. Segundo Rauscher-Gabernig e colaboradores (2009), para que o vinho seja considerado seguro, o teor de histamina não deve ultrapassar 5 $\mu\text{g/mL}$, e o máximo tolerado é 10 $\mu\text{g/mL}$. A Tabela 20 mostra os valores encontrados para as amostras.

Tabela 20. Valores de histamina encontrados nas amostras de vinho analisadas.

	Histamina ($\mu\text{g/mL}$)	Limites de cada país ($\mu\text{g/mL}$)*			
		Alemanha 2	Bélgica 5	França 8	Suíça 10
Histamina_1	3,69	Reprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_2	NQ	Aprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_3	0,76	Aprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_4	4,42	Reprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_5	11,69	Reprovado	Reprovado	Reprovado	Reprovado
Histamina_6	7,91	Reprovado	Reprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_7	ND	Aprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_8	5,48	Reprovado	Reprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_9	7,09	Reprovado	Reprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_10	ND	Aprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_11	3,77	Reprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_12	4,33	Reprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Histamina_13	7,18	Reprovado	Reprovado	Aprovado	Aprovado

* As indicações de cor indicam vinho reprovado (■) ou aprovado (■) em um determinado país europeu.

Observa-se que pelos padrões mais rígidos (Alemanha), apenas quatro vinhos seriam aprovados para comercialização, enquanto que pela legislação mais tolerante (Suíça), apenas uma bebida seria reprovada. Como a histamina é produzida por bactérias que contaminam o mosto, uma pequena quantidade desta amina quase sempre é encontrada, e os valores limites já estabelecidos se encontram próximos à média de histamina que tem sido observado nas amostras. Neste trabalho a média encontrada foi de $4,33 \mu\text{g/mL}$, acima do limite alemão. Entretanto, uma grande dispersão nos valores quantificados foi observado, sendo o desvio padrão de 3,58. Prestes e outros (2007) encontraram valores médios próximos, trabalhando com amostras diretamente extraídas de fermentações experimentais, $3,70 \mu\text{g/mL}$, tendo encontrado valores acima de $1,00 \mu\text{g/mL}$ para todas as amostras. Portanto, nota-se que apesar da necessidade de se avaliar o teor de histamina nas bebidas e de se estabelecer um critério de aprovação ou reprovação, este último influencia bastante os resultados, pois a histamina está naturalmente presente na maioria dos vinhos, como mostra o presente trabalho e outros (LANDETE et al., 2009; SOUZA et al., 2005; MARCOBAL et al., 2006; VIDAL-CAROU et al., 2003).

Os resultados também mostram que a utilização do CLUE-TOF garante resultados rápidos, principalmente devido à rápida eluição e a não necessidade de

derivatização e preparo de amostra, e também alta confiabilidade, devido aos resultados em alta resolução do TOF. Apesar disso, encontra-se muitos métodos na literatura, como os apresentados na Tabela 5, que utilizam derivatização mesmo quando se realiza cromatografia HILIC e detecção por EM. De fato, o presente trabalho mostra que não há necessidade de derivatização quando se utiliza HILIC e detecção por espectrometria de massas.

5.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS EM VINHO E SUCO DE UVA

Os efeitos do consumo moderado e regular de vinho já são amplamente conhecidos e comprovados, como aumento no HDL (lipoproteína de alta densidade), na vasodilatação periférica, e menor incidência de doenças cardiovasculares em relação a bebedores de cerveja ou abstêmios.

Entre eles o resveratrol é o que tem chamado mais atenção nos últimos anos, tendo sido um dos mais estudados quanto a sua atividade biológica (BHAT; KOSMEDER II; PEZZUTO, 2001). O resveratrol é muito mais abundante nos vinhos tintos que nos brancos variando de 0,5 a 6 µg/mL. As maiores concentrações foram encontradas em uvas de variedades cultivadas no sul da França e é produzido em resposta aos estresses de infecção por fungos e outros fatores abióticos.

O resveratrol é um estilbeno com atividade de fitoalexina. Ele e seus análogos estão naturalmente presentes nas uvas nas seguintes formas: resveratrol (trihidroxiestilbeno), tetrahidroxiestilbeno, piceid (trihidroxiestilbeno, 3-O-B-D-glicosídeo), resveratrolósídeo (trihidroxiestilbeno, 4-O-B-D-glicosídeo), e tetrahidroxiestilbeno, 2-O-B-D-glicosídeo. (SOVAK, 2001). Segundo a mesma revisão, as atividades biológicas do vinho não podem ser atribuídas ao resveratrol sozinho. O mesmo, provavelmente, atua em sinergismo ou em adição ao efeito de outros fenólicos. Destes, os mais abundantes encontrados em vinho e uva são o ácido gálico, o ácido *p*-cumárico, o ácido caféico (PAIXÃO et al., 2008). Flavonóides como a quercetina e a catequina também são encontrados no vinho (DIAS, 2009) e possuem atividade biológica podendo contribuir para o efeito do vinho sobre a saúde e destes.

Já as antocianinas como a pelargonidina, amalvidina, a peonidina, a petunidina, a cianidina e a delphinidina, são os flavonóides responsáveis pela cor do

vinho, mas normalmente não são encontradas em sua forma livre na bebida. Com o passar dos meses após a produção as antocianinas vão se condensando, formando taninos, estabilizando a cor da bebida (FLAMINI, 2003).

5.4.1 Parâmetros de detecção e método cromatográfico desenvolvidos

A maioria dos equipamentos TOF não permitem o ajuste individual dos parâmetros de fonte para cada analito a ser analisado em uma única corrida. Portanto, a otimização foi feita para os compostos fenólicos, utilizando-se como base o resveratrol (*m/z* 227), que a princípio seria o fenólico mais importante do vinho.

Na Tabela 21 encontram-se os valores otimizados de fonte encontrados para analisar ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva.

Tabela 21. Valores de fonte obtidos para análise de ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	-
Capilar (kV)	2,5
Cone	25
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	500
Fluxo desolvatação (L/h)	750

As condições cromatográficas foram otimizadas para reduzir o grande efeito de matriz que impedia a visualização dos analitos através de infusão direta.

Foi desenvolvido método com eluição gradiente e as condições encontradas estão na Tabela 22. Foi utilizada coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 150 X 2,1 mm, 1,7 µm, 30 °C. Fase A solução 10 mM de formiato de amônio e Fase B 10 mM de formiato de amônio em MeOH. Volume de injeção 2 µL.

Tabela 22. Gradiente cromatográfico desenvolvido para análise de ácidos orgânicos e fenólicos em vinho e suco de uva.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B	Curva
Inicial	0,2	73	27	Inicial
2,5	0,2	30	70	8
3,5	0,2	30	70	6
4,5	0,2	73	27	6

Devido à natureza dessas substâncias optou-se por utilizar ESI modo negativo. Foram realizados testes em ESI positivo para resveratrol, mas não foi observado o sinal da molécula desprotonada.

5.4.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos eluíram nos dois primeiros minutos da análise como pode ser observado na Figura 52.

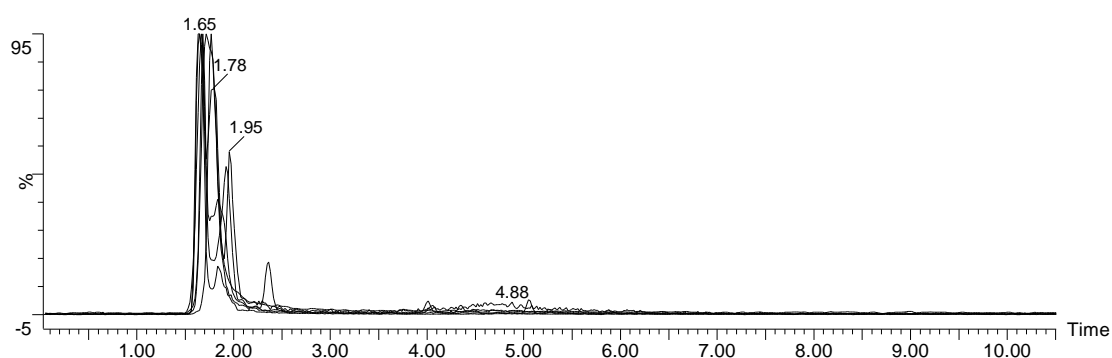


Figura 52. CIE sobrepostos de ácidos orgânicos majoritários presentes em amostra de vinho tinto e suco de uva.

Na Tabela 23 pode-se verificar os ácidos orgânicos identificados e seus respectivos t_R . As seguintes substâncias foram encontradas livres: ácido tartárico, ácido láctico e ácido succínico. Os ácidos málico e cítrico apresentaram dois picos, e o ácido acético apresentou três picos.

Tabela 23. Ácidos orgânicos identificados nas amostras pelo método desenvolvido.

Substância	Massa	Ácidos Orgânicos		Fórmula Molecular	t _R (min)
		Massa Monoisotópica	ESI ⁻		
ORGÂNICOS					
Ácido Tartárico	150	149,0086		C ₄ H ₆ O ₆	1,63
Ácido Málico	134	133,0137		C ₄ H ₆ O ₅	1,68; 1,64
Ácido Cítrico	192	191,0192		C ₆ H ₈ O ₇	1,67; 1,92
FERMENTAÇÃO					
Ácido Acético	60	59,0133		C ₂ H ₄ O ₂	1,65; 1,78; 1,95
Ácido Láctico	90	89,0239		C ₃ H ₆ O ₃	1,77
Ácido Succínico	118	117,0188		C ₄ H ₆ O ₄	1,72

Os ácidos orgânicos presentes no vinho e suco de uva são ácidos dicarboxílicos provenientes das uvas e ácidos provenientes do metabolismo das leveduras e bactérias envolvidas na fermentação do mosto. O perfil desses ácidos confere algumas características ao vinho, ou suco de uva, principalmente a sua acidez, cujo contribuinte majoritário é o ácido málico. A concentração deste ácido tende a ser menor quanto mais madura a uva e maior a temperatura de colheita das uvas. Mostos do hemisfério sul contêm 2 a 3 vezes menos málico do que os mostos produzidos com uvas do hemisfério norte (BIASOTO et al., 2010).

O ácido láctico se origina do metabolismo de bactérias lácticas que atuam na fermentação malolática do processo de vinificação, segunda etapa de fermentação do mosto durante a qual o ácido málico das uvas é convertido em ácido láctico. Isso reduz a acidez da bebida e é fundamental para aumentar a estabilidade frente à contaminação microbiana (DIAS, 2009), pois o ácido láctico é mais difícil de ser aproveitado como nutriente pelas bactérias e fungos que podem colonizar a bebida. Outros dois ácidos são formados durante a fermentação. O succínico e o acético. Esses dois últimos conferem sabor e odor desagradável à bebida, sendo desejado encontrar baixos níveis dessas substâncias. O ácido succínico pode ser associado à um amargor presente em alguns vinhos (BIASOTO et al., 2010). Já nos sucos de uva, espera-se sempre encontrar um teor de ácido málico mais elevado do que em vinhos e não se observar ácidos de metabolismo fermentativo.

Apesar de apresentarem baixa retenção devido à sua hidrofiliabilidade, a alta seletividade e sensibilidade do CLUE-TOF associadas à redução do efeito de matriz pela separação cromatográfica ofereceram ótimos sinais para caracterização desses ácidos, mesmo com n de separação baixo.

Diferentemente do que se observa no ESI positivo, no modo negativo, os ácidos carboxílicos não apresentam facilmente a perda neutra de 46 Da.

Na Tabela 24 são apresentados os resultados das análises de ácidos orgânicos das amostras analisadas.

Tabela 24. Resultado da análise de ácidos orgânicos das amostras. ND não detectado.

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_1	Vinho_2	Vinho_3	Vinho_4	Vinho_5	Suco_1
Ácido Tartárico	7,35	4,47	5,41	7,85	10,80	37,50
Ácido Málico	0,42	0,62	0,19	0,35	0,37	3,11
Ácido Cítrico	0,20	0,21	0,09	0,22	0,14	0,14
Ácido Acético	0,64	0,33	0,39	0,83	1,13	0,42
Ácido Láctico	2,93	1,53	1,71	2,48	2,36	0,60
Ácido Succínico	1,12	1,00	1,11	1,40	1,35	ND

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_7	Vinho_8	Vinho_9	Suco_2	Vinho_11	Vinho_12
Ácido Tartárico	10,50	13,20	7,34	14,30	11,10	9,25
Ácido Málico	0,38	0,63	8,30	7,91	0,40	0,53
Ácido Cítrico	0,09	0,10	2,61	1,06	0,23	0,24
Ácido Acético	0,95	1,53	2,08	2,23	1,24	0,89
Ácido Láctico	3,24	3,49	3,56	1,88	4,39	2,41
Ácido Succínico	2,14	1,73	1,67	ND	1,23	1,19

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_13	Vinho_14	Vinho_15	Vinho_16	Vinho_17	Vinho_18
Ácido Tartárico	4,85	8,97	11,90	8,75	7,89	9,53
Ácido Málico	3,55	0,59	0,61	6,07	0,50	5,88
Ácido Cítrico	0,21	0,29	0,33	0,64	2,28	1,13
Ácido Acético	1,12	0,18	1,28	0,77	0,71	0,91
Ácido Láctico	2,07	2,69	4,08	1,12	3,44	1,69
Ácido Succínico	1,19	1,88	0,99	0,63	0,90	0,94

Observa-se que os ácidos encontrados em maior quantidade nas amostras de vinho foram o tartárico, seguido pelo o láctico e o acético. Esses dados condizem com o perfil de um vinho que passou adequadamente pela etapa de fermentação malolática, onde há redução da quantidade de ácido málico, que confere alta acidez à bebida e é transformado em ácido láctico. A amostra de vinho branco, e as de espumante apresentaram teor de ácido málico maior que os vinhos tintos, com exceção do Vinho_17 (espumante). Outro fator importante que afeta o teor de ácidos orgânicos é o amadurecimento das uvas, pois quanto mais maduras menor o seu conteúdo, especialmente em ácido málico. Altas quantidades de ácido acético

podem indicar que houve pouco cuidado com a sanitização durante o preparo das bebidas (DIAS, 2009).

Por outro lado, as amostras de suco de uva apresentaram alto teor de ácido tartárico, seguido pelo ácido málico. Observou-se também baixo teor de ácidos provenientes do metabolismo microbiano, como já se esperava. A amostra Suco_2 apresentou um valor elevado de ácido acético até mesmo quando comparada com os vinhos, podendo indicar más condições de higiene durante o preparo da bebida. Os ácidos graxos palmítico e esteárico, não foram encontrados. A presença desses dois ácidos confere características mais “oleosas” aos vinhos, e podem ser oxidados originando sabor e odor desagradável. Em geral a fonte desses ácidos é a semente, que ao ser esmagada durante a prensagem os libera para o líquido a ser fermentado (BIASOTO et al., 2010).

5.4.3 Fenólicos de vinho e suco de uva

Os compostos fenólicos identificados no presente trabalho foram separados de acordo com suas características estruturais: Derivados hidroxibenzóicos; derivados cinâmicos; flavonóis e flavanóis, antocianinas e resveratrol.

Os fenólicos encontrados em maior quantidade foram os derivados do ácido cinâmico (Figura 53), e se encontram na Tabela 25.

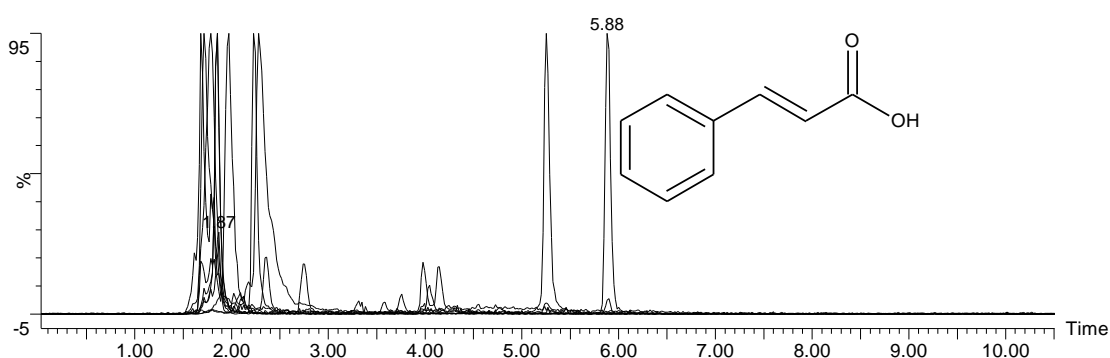


Figura 53. CIE sobrepostos dos derivados do ácido cinâmico detectados nas amostras de vinho e suco de uva.

Tabela 25. Derivados do ácido cinâmico identificados nas amostras de vinho e suco de uva.

Substância	Massa	Derivados Cinâmicos		
		Massa Monoisotópica ESI ⁻	Fórmula Molecular	t _R (min)
Ácido Cinâmico	148	147,0446	C ₉ H ₈ O ₂	1,89; 2,23
Ácido Cumárico	164	163,0395	C ₉ H ₈ O ₃	1,85; 2,12; 2,75; 3,76; 3,98; 4,15; 5,90
Cinamato de Etila	176	175,0759	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	2,28
Aldeído Coniferílico	178	177,0552	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	1,97
Ácido Caféico	180	179,0344	C ₉ H ₈ O ₄	1,68; 1,78; 2,36; 5,25
Cumarato de Etila	192	191,0708	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	1,87; 5,88
Ácido Ferúlico	194	193,0501	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1,72; 1,94; 3,88,
Cafeato de Etila	208	207,0657	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	5,25
Ácido Hidroxiferúlico	210	209,0450	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	1,78; 4,96; 5,27
Feruliato de Etila	222	221,0841	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	4,86
Ácido Coutárico	296	295,0454	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	1,85
Ácido Caftárico	312	311,0403	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	1,68; 1,78
Ácido Clorogênico	354	353,0873	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1,68; 1,85; 2,52 e 4,67

Nas uvas, os derivados do ácido cinâmico costumam ser encontrados na sua forma livre, mas também condensados com outras moléculas, como ácido tartárico, flavonóides ou açúcares. O ESI apesar de ser uma forma branda de ionização, pode fragmentar facilmente algumas moléculas. Em alguns casos mesmo quando os analitos estão condensados com outras substâncias é possível identificá-los pelo *m/z* do analito livre, pois a fragmentação na fonte libera o analito. Nesses casos no cromatograma se observa o *m/z* do analito em t_R diferentes. O ácido cumárico apresentou sete t_R diferentes, sendo que o mais alto (5,90 min) foi identificado como sendo o seu éster etílico. Já em 1,85 min foi identificado o ácido coutárico, condensação do ácido cumárico com o ácido tartárico. Um mesmo *m/z* para diferentes t_R também pode indicar a presença de isômeros na amostra, como acontece também para o ácido cumárico, que possui três isômeros, com a hidroxilia

em posições orto, meta ou para. O ácido caféico apresentou quatro picos. Um sinal em 2,36 min, um em 5,25 min, o cafeato de etila, e dois associados a sua condensação com ácido tartárico para formar o ácido caftárico em 1,68 e 1,78 min. O ácido hidroxiferúlico, também apresentou sinal indicando esterificação com etanol, em 4,96 min. Os espumantes, sucos de uva e o vinho branco apresentaram uma quantidade total de derivados cinâmicos bem inferior aos vinhos tintos.

Dos derivados cinâmicos identificados, os encontrados em menor quantidade foram os ácidos clorogênico e hidroxiferúlico (Tabela 26). O feruliato de etila e o ácido sinápico não foram encontrados nas amostras.

Tabela 26. Proporções de derivados cinâmicos encontrados nas amostras de vinho e suco de uva.

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_1	Vinho_2	Vinho_3	Vinho_4	Vinho_5	Suco_1
Ácido Cinâmico	1,51	1,20	1,12	1,29	1,36	ND
Ácido Cumárico	0,43	0,43	0,63	0,40	0,92	1,35
Cinamato de Etila	3,84	3,84	4,45	3,35	3,25	0,56
Aldeído Coniferílico	0,59	0,71	0,51	1,44	0,71	ND
Ácido Caféico	0,92	0,86	0,53	0,26	1,60	0,88
Cumarato de Etila	1,12	1,97	1,43	1,27	2,42	ND
Ácido Ferúlico	1,56	1,37	1,67	1,67	1,70	0,29
Cafeato de Etila	1,05	1,59	1,95	0,73	1,88	ND
Ácido Hidroxiferúlico	ND	0,21	ND	ND	0,10	0,07
Feruliato de Etila	0,58	0,68	0,60	1,46	0,71	0,58
Ácido Coutárico	0,16	0,11	0,14	0,12	0,11	0,28
Ácido Caftárico	0,12	0,10	0,12	ND	0,14	0,33
Ácido Clorogênico	0,29	0,16	0,50	0,41	0,37	ND

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_7	Vinho_8	Vinho_9	Suco_2	Vinho_11	Vinho_12
Ácido Cinâmico	1,09	1,88	1,16	ND	2,26	1,49
Ácido Cumárico	0,63	0,67	0,17	0,21	0,96	0,92
Cinamato de Etila	5,06	4,72	5,11	ND	4,40	4,25
Aldeído Coniferílico	0,55	0,96	1,55	ND	0,70	1,69
Ácido Caféico	1,32	0,98	ND	0,46	1,55	0,52
Cumarato de Etila	1,44	1,59	0,24	ND	1,49	1,78
Ácido Ferúlico	2,67	2,24	0,35	ND	ND	1,92
Cafeato de Etila	1,60	1,90	0,52	ND	2,37	1,99
Ácido Hidroxiferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	0,19
Feruliato de Etila	0,56	0,67	0,57	0,12	ND	ND
Ácido Coutárico	0,14	0,18	0,69	ND	0,14	0,14
Ácido Caftárico	0,12	0,17	0,37	0,21	0,27	0,12
Ácido Clorogênico	0,71	0,47	ND	ND	ND	ND

Tabela 26. Proporções de derivados cinâmicos encontrados nas amostras de vinho e suco de uva. (continuação)

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_13	Vinho_14	Vinho_15	Vinho_16	Vinho_17	Vinho_18
Ácido Cinâmico	0,88	1,28	1,63	ND	0,98	1,11
Ácido Cumárico	1,15	0,34	1,77	0,15	0,10	0,11
Cinamato de Etila	4,01	4,66	4,03	1,57	4,75	4,05
Aldeído Coniferílico	1,27	0,92	1,13	0,66	1,18	0,76
Ácido Caféico	2,04	0,58	1,29	0,62	0,70	0,80
Cumarato de Etila	1,02	1,73	1,03	1,48	1,15	0,80
Ácido Ferúlico	1,21	2,09	1,98	0,63	0,53	0,57
Cafeato de Etila	1,15	1,05	1,86	ND	0,24	0,15
Ácido Hidroxiferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ferulato de Etila	0,54	0,63	ND	0,19	0,22	0,16
Ácido Coutárico	0,30	ND	0,47	ND	0,11	ND
Ácido Caftárico	0,24	0,12	0,26	0,08	ND	ND
Ácido Clorogênico	0,48	0,35	0,54	ND	ND	ND

O cinamato de etila foi a substância que apresentou maior contagem de íons, com uma proporção entre duas e quatro vezes maior que as outras substâncias.

Os resultados apresentados mostram que os métodos analíticos tem de ter uma ampla abrangência na detecção das moléculas alvo de forma que se possa detectar também os derivados, pois muitas vezes estas moléculas se encontram amplamente ligadas a outras substâncias presentes na amostra. Se os derivados não forem incluídos na detecção a caracterização do perfil da amostra fica comprometida levando a uma subestimação de algumas substâncias, principalmente as que tem maior capacidade de se ligar com outras moléculas. Métodos que utilizam técnicas apenas para detecção por espectrometria de massas, como MALDI-TOF ou TOF por inserção (infusão) direta, não são capazes de identificar isômeros, levando aos mesmos equívocos.

A segunda classe que apresentou maior contagem de íons foram os derivados hidroxibenzóicos, seguido pelos estilbenos. Poucos flavonóides puderam ser detectados nas amostras, e quando isso ocorreu estavam em pequena quantidade.

A Figura 54 mostra os picos referentes aos derivados hidroxibenzóicos, descritos na Tabela 27.

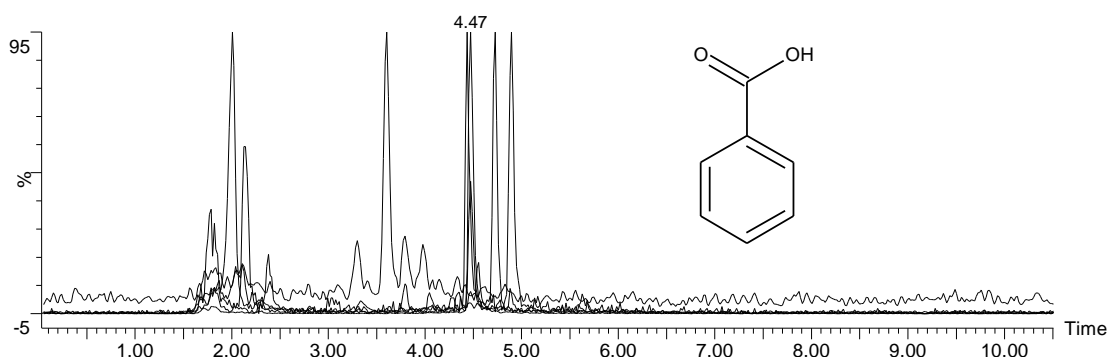


Figura 54. CIE sobrepostos dos derivados do ácido hidroxibenzoico encontrados nas amostras de vinho e suco de uva.

Tabela 27. Derivados do ácido hidroxibenzoico identificados nas amostras de vinho e suco de uva.

Derivados Hidroxibenzoicos				
Substância	Massa	Massa Monoisotópica	Fórmula Molecular	t _R (min)
	a	ESI ⁻		
Ácido Salicílico	138	137,0239	C ₇ H ₆ O ₃	3,6
Ácido Diidroxibenzoico	154	153,0188	C ₇ H ₆ O ₄	4,44; 4,88
Salicilato de Etila	166	165,0552	C ₉ H ₁₀ O ₃	3,57
Ácido Vanílico	168	167,0344	C ₈ H ₈ O ₄	4,66; 4,73
Ácido Gálico	170	169,0137	C ₇ H ₆ O ₅	2,01; 4,47
Diidroxibenzoato de Etila	182	181,0501	C ₉ H ₁₀ O ₄	1,78; 2,12; 4,90
Vanilato de Etila	196	195,0657	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	1,72; 1,78
Galato de Etila	198	197,0450	C ₉ H ₁₀ O ₅	4,47

Assim como para os derivados cinâmicos pode-se observar para os hidroxibenzoicos os picos dos isômeros e dos ésteres. Os ácidos diidroxibenzoicos, ácido gentísico e ácido protocatecuico e seus ésteres etílicos foram os que apresentaram o maior número de picos, seguidos pelo ácido gálico. Na contagem do número de íons por scan os ésteres de ácido gálico e de ácido diidroxibenzoico foram os mais abundantes (Tabela 28).

Tabela 28. Proporções de derivados hidroxibenzoicos encontrados nas amostras.

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_1	Vinho_2	Vinho_3	Vinho_4	Vinho_5	Suco_1
Ácido Salicílico	0,26	0,11	0,10	0,09	0,20	0,95
Ácido Diidroxibenzoico	0,18	0,25	0,48	0,15	0,39	ND
Salicilato de Etila	0,25	0,30	0,39	0,23	0,57	ND
Ácido Vanílico	0,07	0,23	0,67	ND	0,34	ND
Ácido Gálico	0,97	0,99	1,40	1,33	0,62	ND
Diidroxibenzoato de Etila	0,66	0,92	1,38	0,55	0,66	ND
Vanilato de Etila	3,20	1,65	2,09	1,74	2,00	1,73
Galato de Etila	2,93	3,42	3,95	3,65	1,99	0,60

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_7	Vinho_8	Vinho_9	Suco_2	Vinho_1 1	Vinho_1 2
Ácido Salicílico	0,17	0,19	0,40	0,19	0,15	0,15
Ácido Diidroxibenzoico	0,37	0,44	0,17	ND	0,33	0,26
Salicilato de Etila	0,42	0,37	0,71	0,20	0,22	0,12
Ácido Vanílico	0,96	0,63	0,17	ND	0,27	ND
Ácido Gálico	0,86	1,00	ND	ND	0,25	0,19
Diidroxibenzoato de Etila	1,16	0,37	0,86	ND	ND	0,58
Vanilato de Etila	3,08	3,56	4,92	2,80	ND	ND
Galato de Etila	3,29	2,61	0,12	ND	0,71	1,37

	íons / scan X10 ³					
	Vinho_1 3	Vinho_1 4	Vinho_1 5	Vinho_1 6	Vinho_1 7	Vinho_1 8
Ácido Salicílico	0,16	0,14	0,13	0,14	0,18	0,22
Ácido Diidroxibenzoico	0,21	0,77	0,46	ND	ND	ND
Salicilato de etila	0,32	0,44	0,35	0,77	0,19	0,14
Ácido Vanílico	ND	ND	0,51	0,23	ND	0,24
Ácido Gálico	0,32	0,56	0,52	ND	0,14	0,12
Diidroxibenzoato de Etila	1,77	1,43	0,49	0,25	0,33	0,41
Vanilato de etila	1,65	1,30	ND	2,99	2,32	2,77
Galato de etila	2,97	3,91	1,93	0,04	0,33	0,33

Esses dados condizem com os resultados encontrados na literatura, que descrevem o ácido gálico, o cumárico e o caféico como as substâncias fenólicas encontradas em maior quantidade nos vinhos (PAIXÃO et al., 2008). Entretanto, verifica-se no presente trabalho que estas substâncias estão amplamente esterificadas com o etanol proveniente da fermentação. Assim como para os derivados cinâmicos, os benzoicos se apresentaram em menor quantidade nos sucos, mas no caso dos espumantes e do vinho branco a quantidade de benzoicos foi próxima à dos vinhos tintos.

Os flavonóides - flavonóis, flavanóis e antocianinas - foram os fenólicos encontrados em menor quantidade (Figuras 55 e 56).

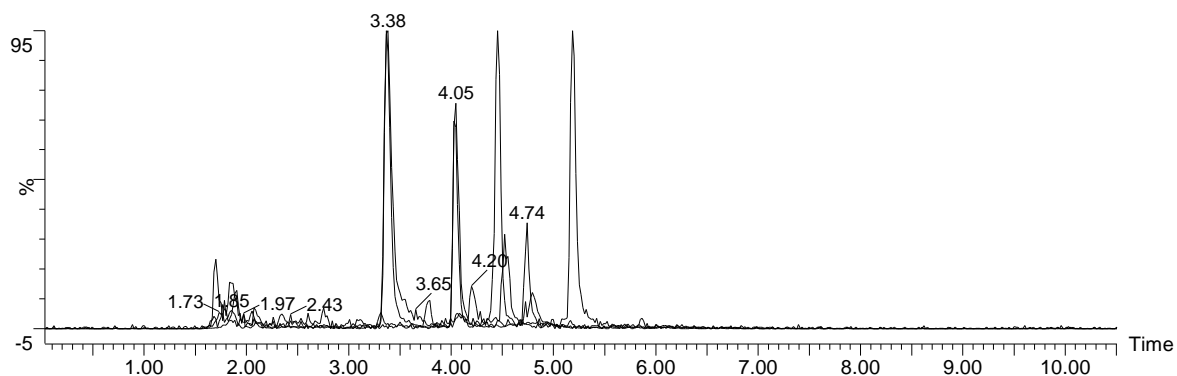


Figura 55. CIE sobrepostos dos flavonóis e flavanóis identificados nas amostras de vinho e suco de uva.

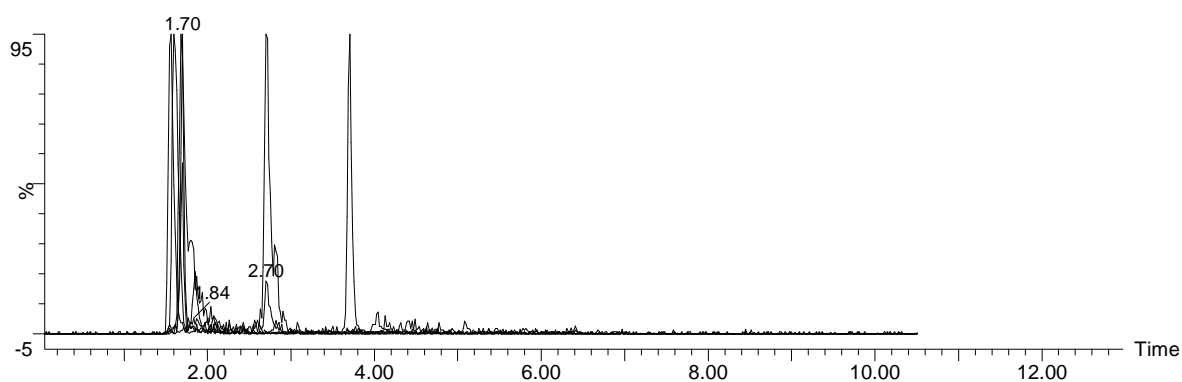


Figura 56. CIE sobrepostos das antocianinas identificadas nas amostras de vinho.

A quantidade de flavonóides encontrada nas amostras foi bastante inferior à dos outros fenólicos. Não pode ser estabelecida uma relação entre a quantidade de flavonóides e os outros fenólicos nas amostras. A Figura 57 mostra a estrutura dos flavonóis e flavanóis pesquisados nas amostras.

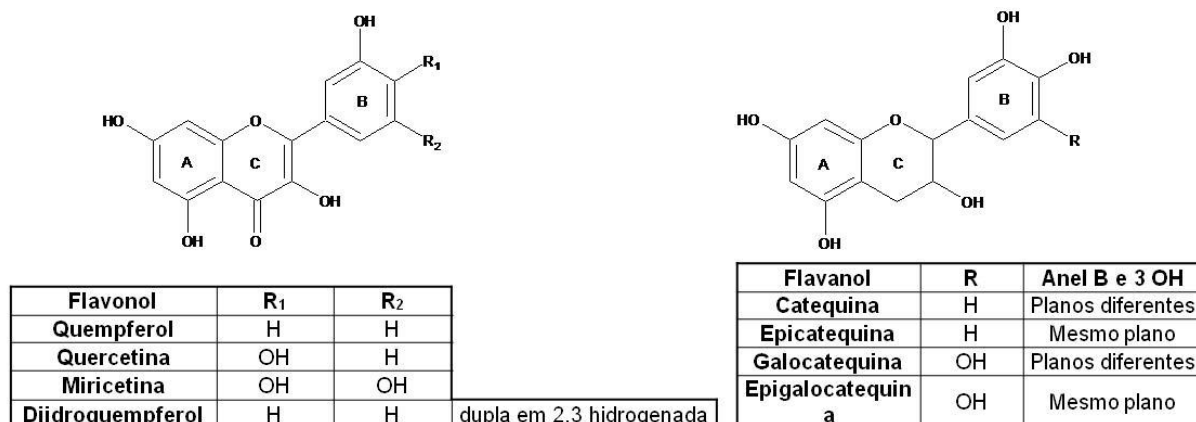


Figura 57. Estrutura dos flavonóis e flavanóis avaliados.

As antocianinas foram encontradas em baixos níveis, mesmo nos vinhos tintos e sucos de uva. Isso acontece porque as antocianinas tendem a se ligar umas as outras, num processo altamente espontâneo de polimerização, que nos vinhos é favorecido pela fermentação. Logo, poucos meses após a produção das bebidas já não é mais possível fazer uma caracterização das mesmas pelo seu teor de antocianinas livres, aciladas ou glicosiladas (FLAMINI, 2003; DIAS, 2009). Apesar disso, nos vinhos jovens as antocianinas monoméricas são as principais responsáveis pela cor (FEI HE et al., 2012). Nesses casos o teor médio de antocianinas totais fica em torno de 500 µg/mL, mais alguns vinhos podem chegar a mais de 2000 µg/mL.

Na Tabela 29 observam-se os flavonóides identificados nas amostras.

Tabela 29. Flavonóides identificados nas amostras.

Substância	Massa	Massa Monoisotópica ESI ⁻	Fórmula Molecular
Quempferol	286	285,0399	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Quempferol Glicosídeo	448	447,0927	
Diidroquempferol	288	287,0556	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Diidroquempferol Glicosídeo		449,1084	
Catequina	290	289,0712	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Catequina Glicosídeo		451,1240	
Quercetina	302	301,0348	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Quercetina Glicosídeo		463,0876	
Galocatequina	306	305,0661	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Galocatequina Glicosídeo		467,1189	
Miricetina	318	317,0297	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Miricetina Glicosídeo		479,0825	

Os principais flavonóis e flavanóis encontrados foram a catequina e a quercetina. No Vinho_9, única amostra de vinho branco analisada não foi encontrado nenhum flavonóide. No Vinho_13, vinho do porto, também não foi encontrado flavonóide. O Quempferol foi encontrado apenas na sua forma glicosilada.

As antocianinas podem ser encontradas nos vinhos na sua forma livre (antocianidinas) e glicosilada, nas formas hidratada (pseudobase carbinol), devido ao pH da fase móvel, e com adição de bissulfito. O bissulfito é um aditivo utilizado como conservante e para sanitização do mosto antes da inoculação das leveduras. Pode atuar como nucleófilo se adicionando ao anel C das antocianinas na posição 4, e foi a única forma de antocianina encontrada neste trabalho. Foram encontradas as antocianidinas bissulfitadas petunidina, malvidina e delphinidina, mas apenas em três amostras, os Vinhos_15, 7 e 3.

A Figura 58 mostra a estrutura geral das antocianinas e após a reação com água e bissulfito.

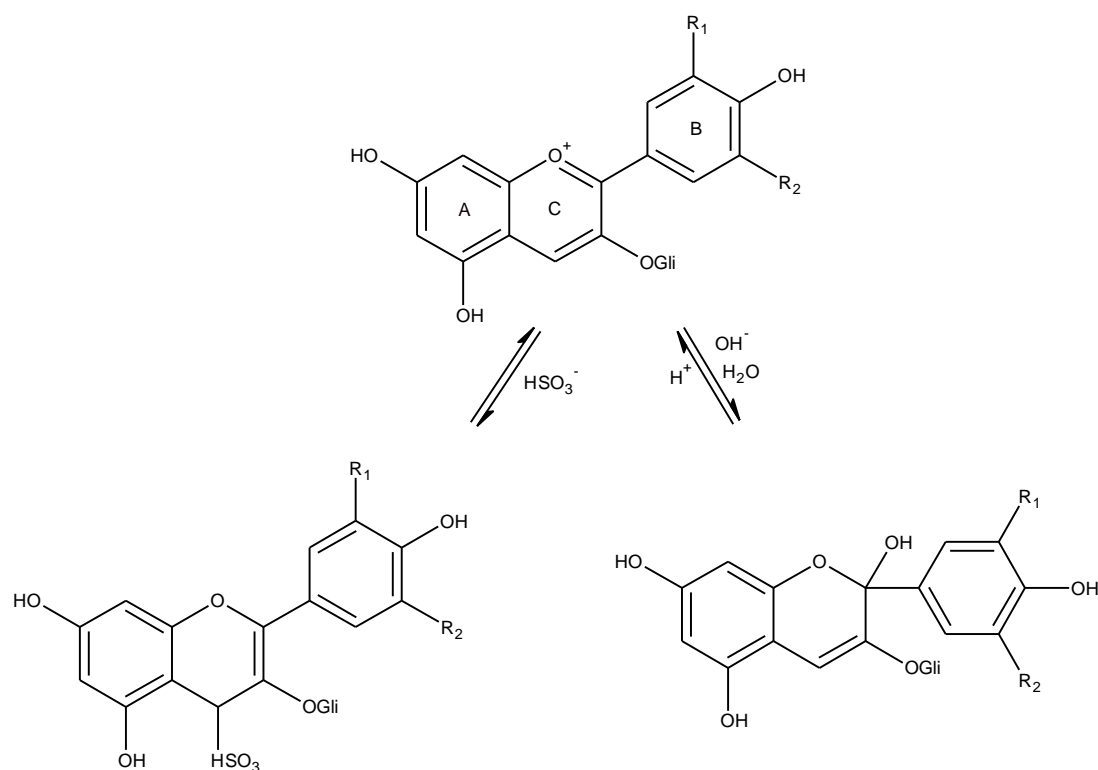


Figura 58. Estrutura geral das antocianinas e após reação de hidratação e adição de bissulfito.

O resveratrol é o representante mais importante da classe dos estilbenos presentes no vinho.

O CIE do resveratrol apresentou três picos principais nas amostras de vinho e dois picos nas amostras de suco de uva Figura 59.

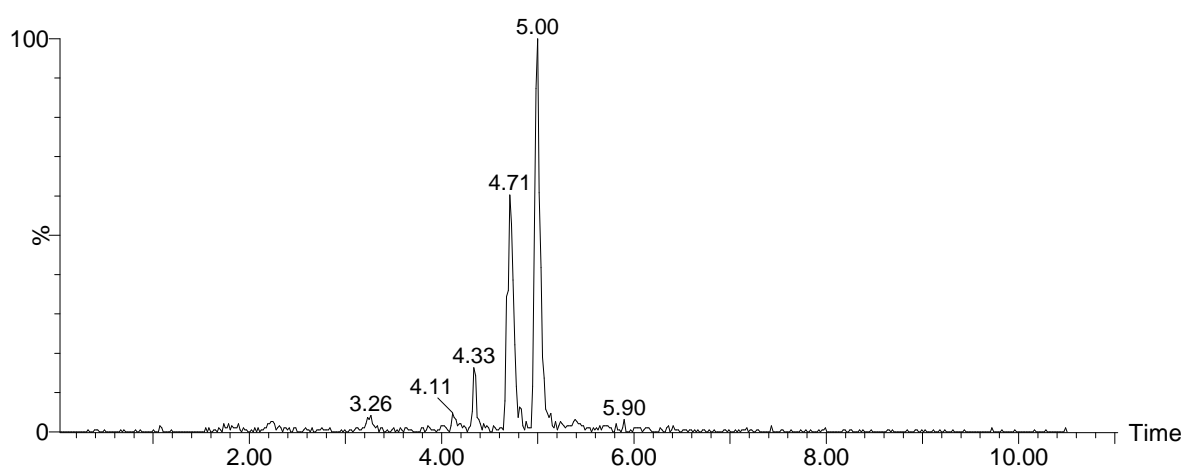


Figura 59. CIE de resveratrol presente em amostra de vinho. Resveratrol livre na amostra t_R 5,00 min e resveratrol glicosilado t_R 4,33 e 4,71 min.

Os picos com t_R 4,33 min e t_R 4,71 apresentaram espectro de massas idêntico (Figura 60).

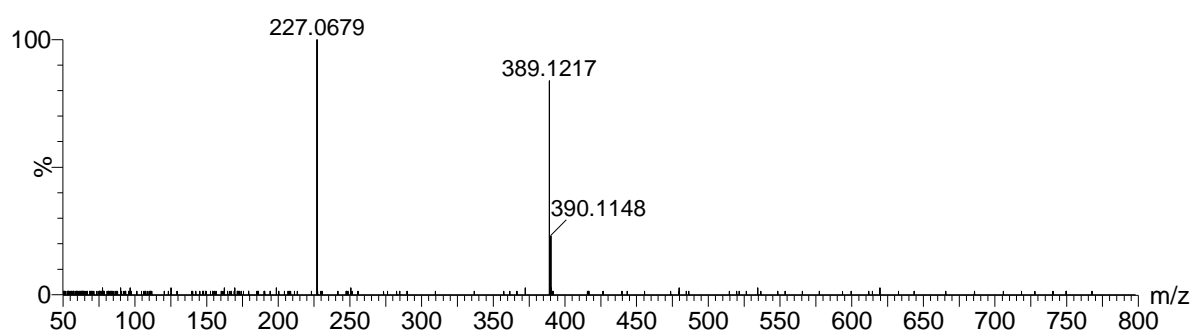


Figura 60. Espectro de massas do Resveratrol desprotonado, $[M - H]^-$ m/z 227, e resveratrol glicosilado $[M - H + 162]^-$ m/z 389.

O íon de m/z 389 corresponde à molécula de resveratrol ligada à um açúcar de seis carbonos. A diferença entre os dois sinais observados no espectro de massas anterior (m/z 389 - 227), 162 Da, corresponde à fragmentação do íon 389,

levando à perda da hexose, gerando o íon m/z 227, que corresponde ao resveratrol desprotonado (Figura 61).

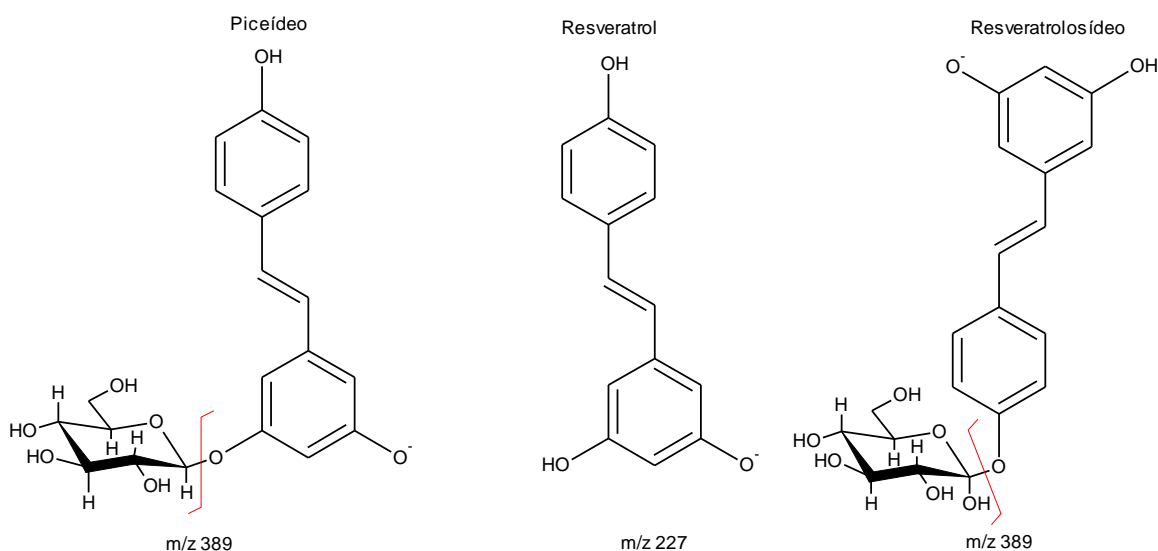


Figura 61. Resveratrol desprotonado e seus análogos naturais glicosilados desprotonados, forma detectável nos EM.

Nos vegetais o resveratrol, assim como outras substâncias fenólicas como os flavonóides, se encontra ligado à moléculas de açúcar. O piceídeo (resveratrol 3 O-glicosídeo) é a forma mais abundante de resveratrol presente nas uvas. Existe também um outro análogo glicosilado que é naturalmente encontrado em menor quantidade, o resveratrolósídeo (resveratrol 4'-O-glicosídeo) (SOVAK, 2001). Os isômeros *cis* não são biossintetizados pelos vegetais, entretanto, a ação da luz incidindo sobre o suco da uva, mosto ou mesmo garrafas de vinho, pode induzir uma isomerização (GALEANO-DÍAZ, DURÁN-MERÁS, AIRADO-RODRÍGUEZ, 2007).

Os resultados apresentados indicam, pela intensidade dos sinais, que o primeiro pico é referente ao resveratrolósídeo e o segundo ao piceídeo. Já o terceiro sinal, encontrado apenas nas amostras de vinho não apresentou o íon de m/z 389, somando-se esse fato ao maior t_R em relação aos outros dois picos, infere-se que este terceiro pico é referente ao resveratrol em sua forma livre.

O n da separação, necessário para separar os isômeros e possibilitar a sua identificação foi de 40000 pratos teóricos. Isso demonstra a importância de uma boa separação cromatográfica não só para eliminar o efeito de matriz que causa supressão iônica em ESI, mas também para separar e identificar isômeros, que apresentam muitas vezes os mesmos sinais no espectro de massas. Nesse caso,

separações utilizando colunas modernas tem um grande potencial para simplificar essas análises.

A observação da presença do resveratrol em sua forma livre apenas nas amostras de vinho indica que a fermentação tem papel fundamental na hidrólise da ligação glicosídica para liberar o resveratrol na bebida.

O resveratrol é muito mais abundante nos vinhos tintos que nos brancos variando de 0,5 a 6 µg/mL, devido à diferença no processo de produção. As maiores concentrações foram encontradas em uvas cultivadas no sul da França e são produzidos em resposta ao estresse de infecção por fungos e também fatores abióticos (SOVAK, 2001). No presente trabalho observou-se uma grande variação no teor de resveratrol e na proporção entre o analito livre e o glicosilado (Tabela 30), dado praticamente ignorado pela literatura.

Tabela 30. Resveratrol encontrado nas amostras de vinho e suco de uva.

Bebida	íons / scan		
	Resveratrol	Glicosídeo Total	Resveratrol Total
Vinho_1	16	341	357
Vinho_2	32	281	313
Vinho_3	58	319	377
Vinho_4	ND	94	94
Vinho_5	107	146	253
Suco_1	ND	297	297
Vinho_7	42	1002	1044
Vinho_8	33	317	350
Vinho_9	ND	ND	ND
Suco_2	ND	65	65
Vinho_11	78	160	238
Vinho_12	ND	ND	ND
Vinho_13	ND	263	263
Vinho_14	40	453	493
Vinho_15	33	251	284
Vinho_16	ND	ND	ND
Vinho_17	ND	ND	ND
Vinho_18	ND	ND	ND

Nos vinhos brancos analisados (Vinho_9, 16, 17 e 18) não se observou resveratrol em nenhuma forma. Já nos vinhos 4 e 13, assim como nos sucos de uva, não se observou o resveratrol em sua forma livre, apenas glicosilado. Ambos os vinhos são da Região do Porto, em Portugal. Todos os vinhos tintos apresentaram resveratrol glicosilado. A proporção de resveratrol glicosilado para o resveratrol livre variou bastante de amostra para amostra, entretanto, a quantidade do analito livre foi

quase sempre bastante inferior à do analito glicosilado. A maior porcentagem de resveratrol livre em relação ao ligado à açúcares foi para o Vinho_5, que apresentou quantidade de resveratrol livre próxima à de resveratrol glicosilado (73 %). O Vinho_7, produzido em Santana do Livramento, na fronteira do Brasil com o Uruguai, foi o que apresentou maior quantidade de resveratrol total, sendo que 96 % do seu resveratrol estava na forma glicosilada, 50 % piceídeo e 50 % resveratrolósídeo, e junto com a amostra Vinho_4 foram as únicas bebidas em que a proporção dos dois glicosídeos foi a mesma, pois na grande maioria das amostras o piceídeo foi o estilbeno majoritário. O Vinho_4 foi a amostra de vinho tinto que apresentou menor teor de resveratrol total, 9 % do conteúdo da amostra Vinho_7 e 28 % da média para os vinhos tintos que foi 341 ions/scan.

Observou-se também que no sistema utilizado, onde não houve aumento de energia para fragmentar o analito, aproximadamente 50 % do resveratrol glicosilado se fragmentou antes de chegar ao analisador.

A princípio tentou-se diferenciar os dois isômeros do resveratrol glicosilado através do grau de fragmentação da molécula desprotonada, perdendo 162 Da. Essa fragmentação para ocorrer implica em um rearranjo de hidrogênio, portanto, a facilidade com que ocorre esse rearranjo a princípio se refletiria na proporção $[M - H]^- / [M - H - 162]^-$ encontrada nos picos referentes ao resveratrol glicosilado. Entretanto, não se observou diferença significativa nessa proporção para as amostras analisadas. Na Figura 62 é mostrada uma proposta para o mecanismo de fragmentação do resveratrol levando à perda de 162 Da.

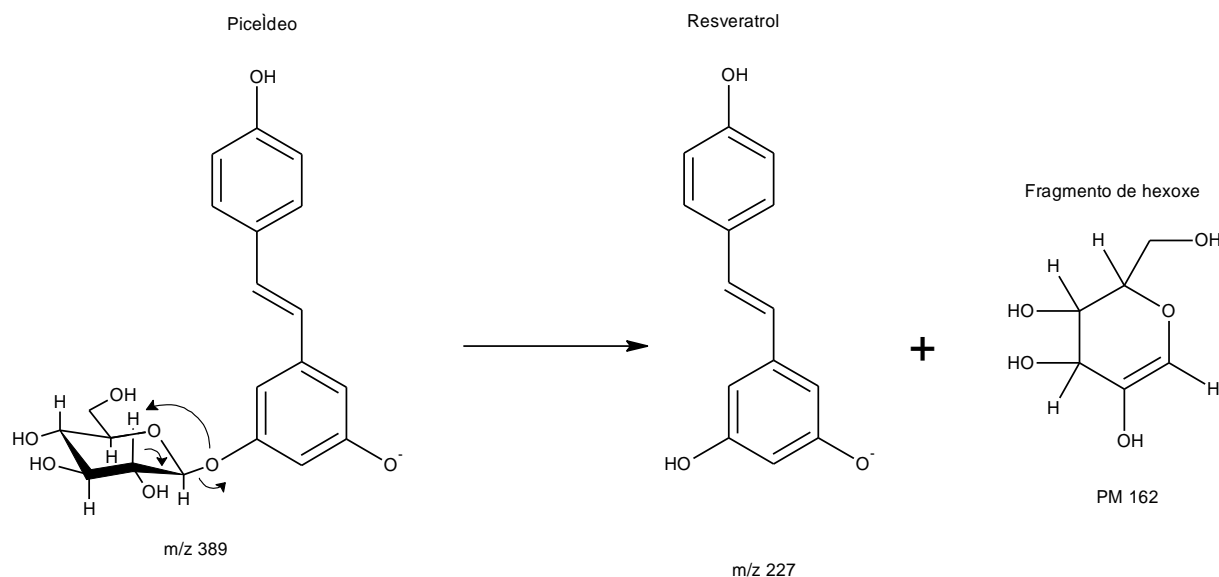


Figura 62. Proposta de fragmentação do resveratrol glicosilado.

O Processo de fabricação dos vinhos e sucos de uva influencia sobremaneira a quantidade de fenólicos (DIAS, 2009; SOVAK, 2001). Uma vez que a maior parte dessas substâncias se concentra na casca das uvas, quanto maior o tempo de contato do mosto com a casca ou a intensidade da prensagem, maior o teor de fenólicos.

A grande diferença entre a vinificação em tinto e em branco é que o último é realizado com a ausência das cascas ou sem maceração das mesmas, influenciando diretamente na quantidade de fenólicos no mosto.

Muitos trabalhos tem sido publicados investigando as atividades biológicas tanto do vinho quanto do suco de uva e do resveratrol e análogos isolados (GALEANO-DÍAZ, DURÁN-MERÁS, AIRADO-RODRÍGUEZ, 2007; SOVAK, 2001; BHAT, KOSMEDER II, PEZZUTO, 2001; PAIXÃO et al., 2008). Estes trabalhos mostram que os efeitos cardioprotetores e antioxidantes do vinho são, provavelmente, decorrentes dos altos teores de compostos fenólicos presentes nessa bebida. Provavelmente essa ação é creditada ao efeito aditivo ou potencializado dos fenólicos, pois apesar de exibirem atividade biológica, *in vitro* e *in vivo*, quando isolados tanto o resveratrol, quanto os outros fenólicos não possuem biodisponibilidade em concentrações mínimas para alcançar esses efeitos *in vivo*.

5.5 ANÁLISE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PADRÕES CROMATOGRÁFICOS

A utilização de padrões cromatográficos de alta qualidade para uma adequada identificação ou quantificação de um analito é fundamental quando se utiliza técnicas cromatográficas de análise. A CLAE-EM é uma técnica excelente para se verificar a pureza dos padrões cromatográficos (CARON, 2006), que se não armazenados, ou transportados adequadamente podem produzir interferentes que comprometem os resultados. Em alguns casos pode ser difícil obter comercialmente alguns padrões, principalmente no caso do Brasil onde a maioria dos padrões tem de ser importado (PACHECO, 2009; GOUVÊA et al., 2012).

Para a identificação do t_R , e principalmente a quantificação de uma substância por CLAE, ou CLUE com detecção convencional, se utiliza um padrão cromatográfico, quase sempre uma substância pura, que ao ser injetado numa concentração conhecida fornece os dados de tempo de retenção e área dessa substância para a análise em questão. Contudo a obtenção desses padrões é crítica no Brasil, pois estes em sua maioria precisam ser importados, e devido às condições adversas enfrentadas durante o transporte que afetam sua principal característica, a pureza.

5.5.1 Betacaroteno, zeaxantina

Os carotenóides possuem perfis de absorção bem definidos nos comprimentos de onda do visível. A princípio isso tornaria fácil sua caracterização utilizando detectores de arranjo de fotodiodos. Entretanto, essas substâncias são divididas em duas classes: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos altamente insaturados com ligações duplas conjugadas. Já as xantofilas possuem uma estrutura básica dos carotenos acrescida de oxigênios. Desta forma elas compartilham o mesmo cromóforo, resultando em espectros de UV/VIS muito próximos

A Figura 63 mostra a estrutura do betacaroteno (caroteno) e da zeaxantina (xantofila), que apresentam o mesmo cromóforo demonstrado pela Figura 64.

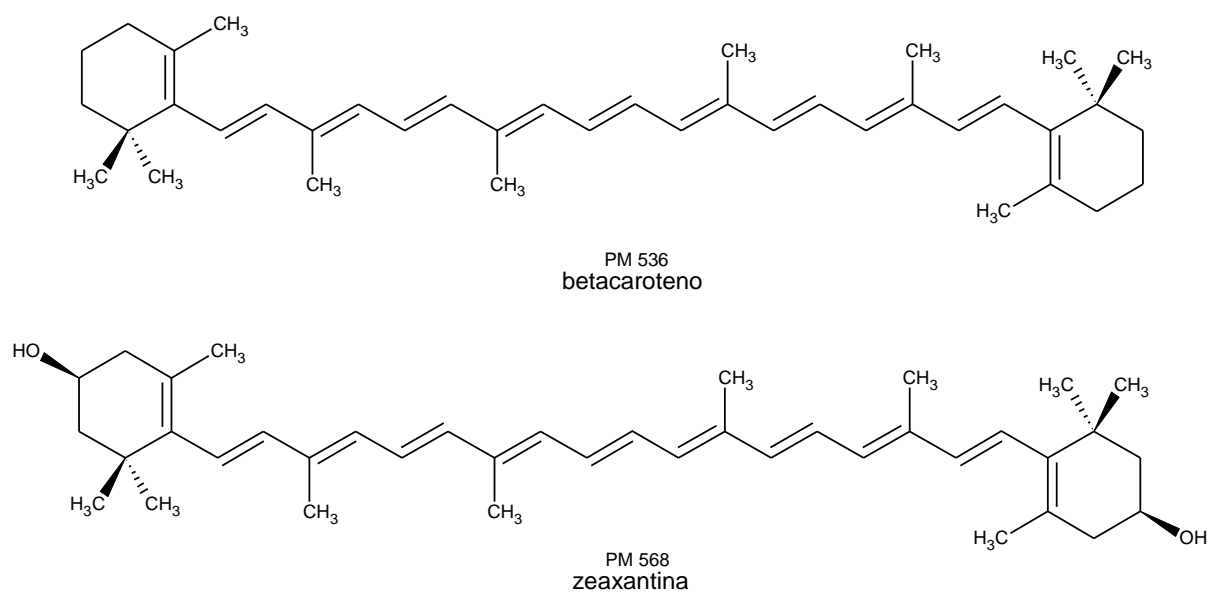


Figura 63. Estruturas do betacaroteno e da zeaxantina.

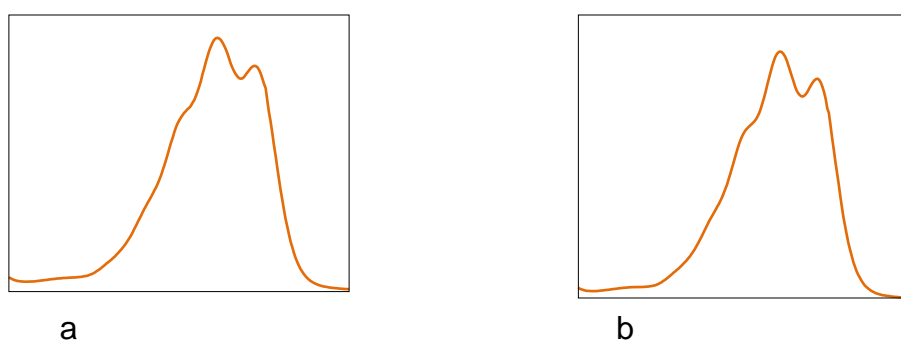


Figura 64. Espectros de VIS do betacaroteno (a) e da zeaxantina (b).

Os resultados obtidos para estes analitos não foram condizentes com os verificados anteriormente por Guarantine e outros (2004). As condições ótimas de fonte de íons encontradas estão na Tabela 31.

Tabela 31. Valores de fonte encontrados para análise de betacaroteno e zeaxantina.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	4
Cone	25
Temperatura fonte (°C)	80
Temperatura desolvatação (°C)	150
Fluxo desolvatação (L/h)	500

Guarantine e outros (2004) solubilizaram os analitos em metanol: água, ou metanol: diclorometano: acetato de etila, sendo a concentração final dos analitos de 250 µg/mL. No presente trabalho somente foi possível utilizar soluções dos analitos em concentrações inferiores a 1 µg/mL. Concentrações superiores provocavam adsorções de difícil limpeza dos analitos no capilar da inserção direta e na fonte (“carry over”).

Nessas concentrações mais baixas, só foi possível observar o betacaroteno e a zeaxantina por inserção direta, dissolvidos em acetona grau HPLC e MeOH, com os parâmetros de fonte citados anteriormente (Tabela 30). Tentou-se realizar a injeção no TOF através do CLUE, mas não foi observado sinal do analito. A princípio, parece que a alta lipofilicidade destes analitos os deixou muito retidos nas colunas RP utilizadas, não sendo possível eluí-los com a fase móvel normalmente utilizada em CLAE-EM. A Figura 65 mostra espectro de massas betacaroteno, observando-se o íon molecular m/z 536, e a Figura 66 mostra o espectro de massas da zeaxantina, observando-se o íon molecular m/z 568.

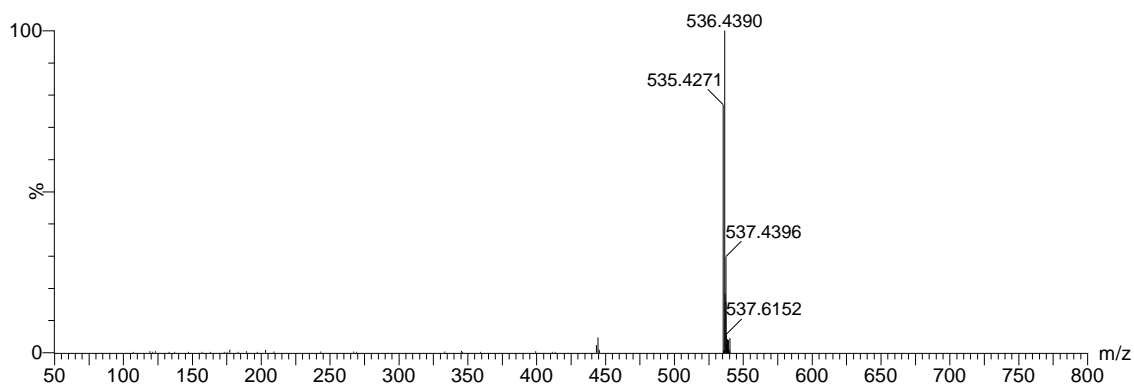


Figura 65. Espectro de massas do betacaroteno mostrando o íon molecular m/z 536, e um sinal bem pequeno referente à perda de tolueno m/z 444.

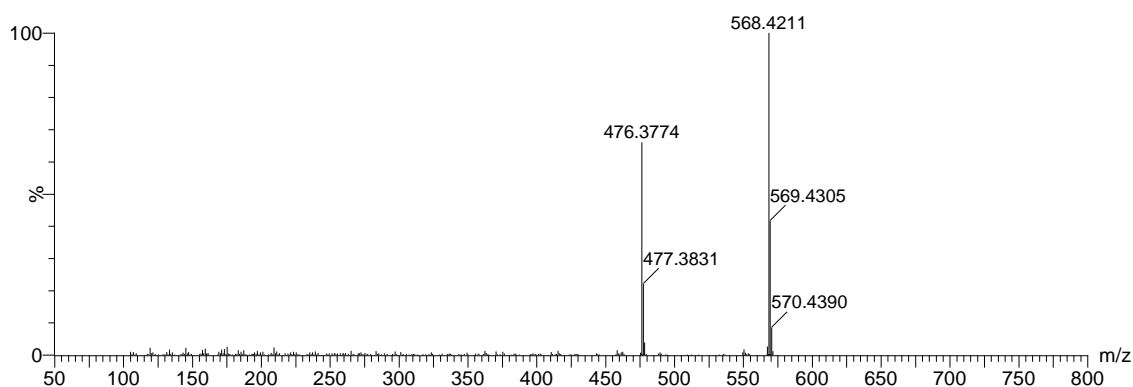


Figura 66. Espectro de massas da zeaxantina mostrando o íon molecular e a perda de tolueno m/z 476.

O espectro do betacaroteno mostra o íon molecular M^{+} m/z 536 e o fragmento característico de carotenóides derivado da perda de tolueno $[M - 92]^{+}$ m/z 444. No espectro da zeaxantina observa-se o íon molecular, m/z 568, e assim como para o betacaroteno, observou-se o fragmento, $[M - 92]^{+}$ m/z 476.

Já Guarantine e outros (2004) observaram sinais para o betacaroteno apenas quando utilizavam potenciais de capilar abaixo de 1kV e observaram também o sinal da molécula protonada, o que não ocorreu no presente trabalho.

O solvente utilizado nestas análises, acetona, não consegue transferir prótons para os analitos, o que levou a zeaxantina, mesmo possuindo duas hidroxilas (Figura 64) a apresentar o íon molecular ao invés da molécula protonada. Por outro lado, quando se utilizou solvente prótico com ácido fórmico, não se observou o sinal dos analitos.

Os dados do presente trabalho confirmam o perfil variado dos mecanismos de ionização envolvidos no ESI. Carotenóides como o betacaroteno e a zeaxantina, que possuem um nuvem π expressiva, podem ter sua ionização por processos oxidativos favorecida em detrimento de uma reação ácido base, principalmente em moléculas que não contém sítios com alta afinidade protônica. O presente trabalho mostrou que a zeaxantina, mesmo com duas hidroxilas, se ionizou através da perda de um elétron, como ocorre na ionização por elétron (EI), amplamente utilizada acoplada à cromatografia gasosa.

Comparando-se os espectros de massas das Figuras 65 e 66 também percebe-se que a extensão da fragmentação do íon molecular da zeaxantina é muito maior que a do betacaroteno. A intensidade do íon m/z 444 é de aproximadamente 5 % do pico base (íon molecular do betacaroteno), enquanto que do íon m/z 476 é de aproximadamente 70 % do íon molecular da zeaxantina, indicando que a presença da hidroxila no anel estabiliza os fragmentos favorecendo a quebra. Na Figura 67 se encontra uma proposta para a formação o íon $[M - 92]^+$.

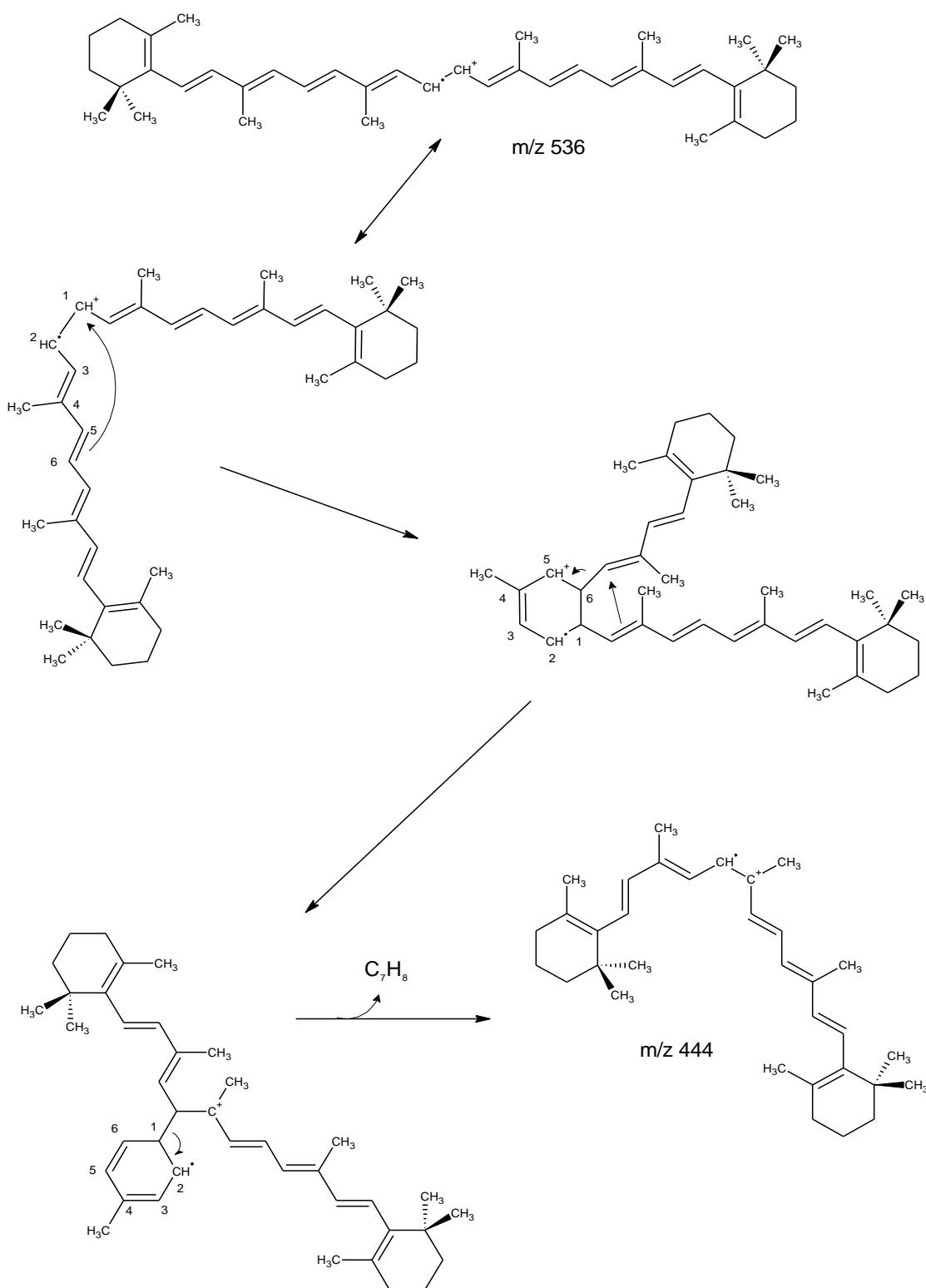


Figura 67. Proposta de fragmentação do betacaroteno liberando tolueno ($[M - 92]^+$).

Outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) são capazes de fornecer informações mais precisas sobre a estrutura dos carotenóides, mas precisam de uma quantidade bem maior de amostra do que a necessária para

análises cromatográficas. Contudo, o método desenvolvido para CLUE-TOF, somado às informações de t_R obtidas por análises cromatográficas por CLAE, é capaz de fornecer informações suficientes para garantir a identidade dessas substâncias.

5.5.2 Retinol

O retinol foi isolado de uma matriz extremamente complexa, o fígado. Apesar de ser uma rica fonte desse derivado do betacaroteno, o fígado é o principal órgão de metabolização dos animais, concentrando diversas substâncias de naturezas diferentes. Nesses casos é maior a importância de uma técnica capaz de fornecer informação estrutural do analito em estudo.

o comportamento do retinol, como esperado, foi bem diferente do comportamento dos carotenóides. Foi possível a realização de análise cromatográfica e as melhores condições obtidas foram através de análise cromatográfica com fase móvel ACN:água 50:50 (v:v) e ácido fórmico 0,1 % (v:v). As condições cromatográficas foram: eluição isocrática, fluxo 0,25 mL/min, coluna Waters XTerra RP 18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) em uma temperatura 24 °C. O volume de injeção foi de 1 μ L. Os parâmetros de detecção se encontram na Tabela 32.

Tabela 32. Valores de fonte encontrados para análise de retinol.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	4
Cone	25
Temperatura fonte (°C)	100
Temperatura desolvatação (°C)	200
Fluxo desolvatação (L/h)	300

Diferentemente dos carotenóides, o retinol possui características que favorecem a ionização por reação ácido base, levando à protonação da hidroxila. Sua estrutura insaturada com ligações duplas conjugadas, favorecem a desidratação da molécula protonada na fonte, formando o íon m/z 269 (Figura 68), única espécie visível no seu espectro de massas (Figura 69). Esse resultado é divergente do encontrado por Guarantine e outros (2004) cujos dados indicam a presença do íon

oriundo da desidratação da molécula protonada, a molécula protonada e o íon molecular.

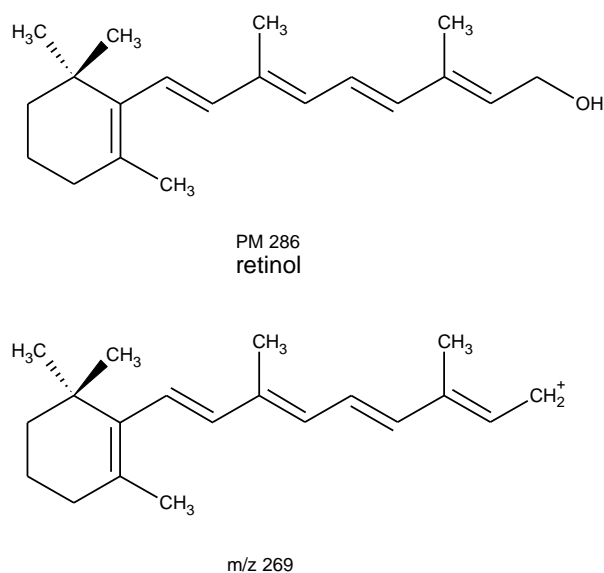


Figura 68. Retinol e o fragmento detectável por CLUE-TOF, m/z 269.

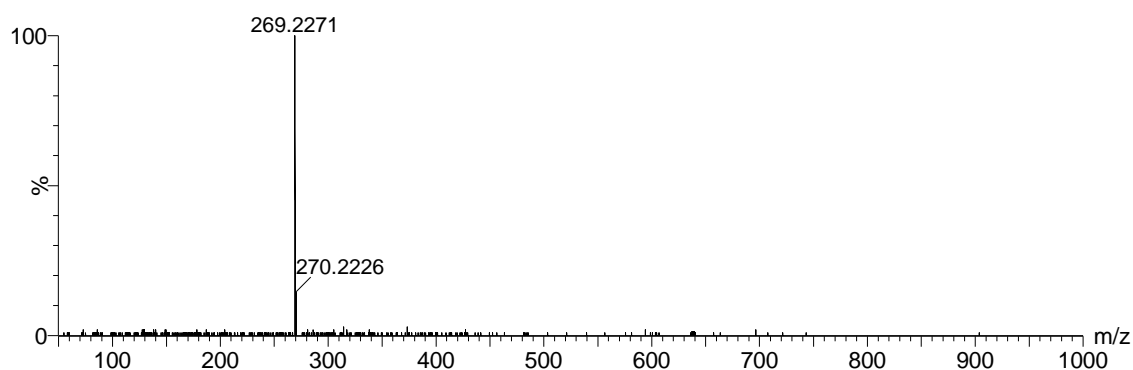


Figura 69. Espectro de massas do retinol obtido a partir do padrão produzido no laboratório.

É muito comum a afirmam que a ionização por ESI é uma ionização branda, diferentemente da ionização por EI, o que possibilita visualizar o m/z da molécula protonada. Isso depende muito do sistema e do solvente utilizados, sendo que alguns tipos de fonte ESI, como a utilizada no Synapt, facilitam a fragmentação, levando, algumas vezes à não visualização da molécula protonada, que pode levar a falsos negativos. A utilização de um analisador que opera em “full scan” permite a solução de casos como estes, quando se espera encontrar um determinado íons

(alvo m/z 287), mas o que se observa é um ou íon que caracteriza a molécula em estudo (não alvo m/z 269).

5.5.3 Antocianinas

São encontradas diversas antocianinas em alimentos, mas destas são apenas seis as antocianidinas (porção flavonóide da antocianina, sem o açúcar): pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina.

Essas substâncias se diferenciam entre si apenas pelo número de hidroxilas ou metoxilas.

O cromóforo da molécula é o mesmo para todas elas, sendo que as diferenças nos espectros de luz visível utilizados para caracterização destes flavonóides são muito sutis. Isso tudo somado ao t_R e que é também muito próximo gera muitas dúvidas nas análises e caracterizações.

O método desenvolvido possibilita uma rápida identificação das antocianinas isoladas, ou parcialmente purificadas extraídas de diferentes matrizes, inclusive detectando coeluições não visíveis por CLAE, sem a necessidade de utilização de RMN, técnica mais refinada, porém que exige maior quantidade do analito isolado para gerar resultados conclusivos

As condições cromatográficas ótimas encontradas para a identificação dos padrões de antocianinas isolados são mostrados na Tabela 33. Foi utilizada coluna Acquity UPLC BEH C18, Waters, 150 X 2,1 mm, 1,7 μ m, 30 °C. Fase A solução de ácido fórmico 0,1 % (v:v) e Fase B metanol. Volume de injeção 2 μ L.

Tabela 33. Condições cromatográficas ótimas encontradas para análise de antocianinas.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B	Curva
Inicial	0,3	73	27	Inicial
2,5	0,3	30	70	8
3,5	0,3	30	70	6
4,5	0,3	73	27	6

Os parâmetros de fonte otimizados se encontram na Tabela 34.

Tabela 34. Parâmetros de fonte ótimos encontrados para análise de antocianinas.

Parâmetro	Valor Otimizado
Tipo	ESI
Modo	+
Capilar (kV)	3
Cone	25
Temperatura fonte (°C)	120
Temperatura desolvatação (°C)	500
Fluxo desolvatação (L/h)	750

Diferentemente do modo ESI negativo, no ESI positivo as antocianinas são identificadas na sua forma como íons flavílio, que possui naturalmente uma carga positiva, facilitando sua detecção. Apesar disso, observou-se que a sensibilidade aumenta quando se utiliza ácido fórmico (0,1 %, v:v) no solvente. Provavelmente devido ao abaixamento do pH induzido pelo ácido, que desloca o equilíbrio para a forma ionizada.

Assim como os fenólicos encontrados no vinho e suco de uva, as antocianinas das outras matrizes se encontram numa diversidade de formas, ligadas a açúcares, aciladas e também na forma aglicona. O método desenvolvido foi capaz de identificar essas substâncias para uma perfeita caracterização dos padrões isolados garantindo sua qualidade como padrão analítico.

Gouvea e outros (2012) em seu trabalho de isolamento e purificação de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo para produção de padrões analíticos para CLAE utilizam amostras de açaí liofilizadas como fonte das antocianinas. O açaí se mostrou uma ótima matriz para esse fim, tendo em vista sua composição de antocianinas ser exclusivamente composta de cianidina. Observou-se que algumas matrizes, como a amora, possuem uma grande diversidade de antocianinas, que se combinam com açúcares, e estas algumas vezes se encontram aciladas, requerendo uma maior complexidade na separação cromatográfica para obter os padrões analíticos.

A Figura 70 mostra a coeluição de três antocianinas encontradas em romã: cianidina-diglicosídeo (m/z 611), delphinidina-glicosídeo (m/z 465) e cianidina-rutinosídeo (m/z 595). Mesmo com a coeluição foi possível a diferenciação.

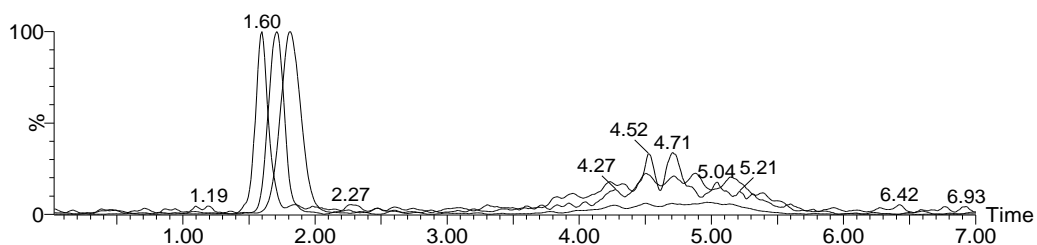


Figura 70. CIE sobrepostos de cianidinas e delphinidina de romã coelundo.

Na Figura 71 pode-se observar a fragmentação das antocianinas, liberando os açúcares ligados às hidroxilas formando a antocianidina. Dessa forma pode-se também identificar os substituintes ligados aos oxigênios das antocianidinas.

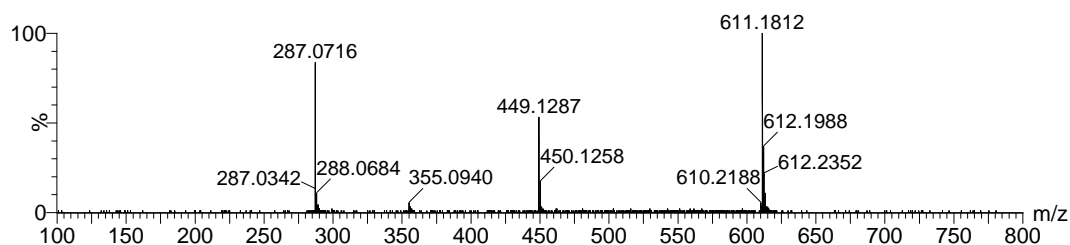


Figura 71. Espectro de massas da cianidina-diglicosídeo, liberando em etapas os açúcares substituintes.

No espectro de massas da Figura 71 observa-se a cianidina-diglicosídeo, m/z 611, liberando uma das moléculas de glicose para formar a cianidina-glicosídeo, m/z 449, e em seguida liberando a aglicona cianidina, m/z 287.

O método desenvolvido mostrou-se capaz de identificar rapidamente as antocianinas presentes em uma amostra, que no caso foi previamente isolada por CLAE para servir de padrão. Entretanto, a boa sensibilidade obtida e capacidade de separação permite que o método seja utilizado como método de “screening” ou confirmação da identidade de antocianinas em amostras ainda não totalmente isoladas.

5.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar de historicamente os TOF não serem adequados à quantificação, principalmente devido à pequena taxa de aquisição de dados, e a incapacidade dos detectores de íons dos TOF, os MCP, que são conversores analógico-digitais, fornecerem dados proporcionais à quantidade de íons de mesma massa que chegam ao mesmo tempo (“dead time”), os resultados desta tese demonstram que o avanço nos sistemas de análise e detecção tem permitido aos TOF uma velocidade de aquisição de dados compatível com CLAE e até mesmo CLUE.

Apesar da importância da utilização hifenada dos CLUE com EM o problema para se compatibilizar esse acoplamento não ficou somente na adequação do fluxo do efluente do cromatógrafo com a fonte de íons. Com exceção dos quadrupolos e suas variações (QqQ e Qtrap), o ciclo de aquisição de dados dos EM é relativamente lento quando comparado com outros detectores utilizados em cromatografia líquida. Isso se torna um problema mais significativo quando se utiliza CLUE, com picos muito finos (poucos segundos de largura) (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013). Cada ciclo de aquisição resulta em um ponto de um pico cromatográfico. Uma aquisição lenta de dados pode resultar na formação de picos deformados, não gaussianos, o que afeta a quantificação, ou levar a união de picos de isômeros, afetando também a caracterização/ seletividade. Quanto mais demorada a aquisição de dados, mais intenso será o sinal no cromatograma, e conseqüentemente maior sensibilidade terá uma análise, contudo, quanto mais rápida for a aquisição, mais pontos terá um pico favorecendo o formato gaussiano, e aumentando a precisão de uma quantificação, portanto, a velocidade de aquisição é um fator importante a se considerar quando se faz o acoplamento de um CLAE, ou CLUE a um EM.

Quando se compara os TOF aos “traps”, como o Orbitrap, a resolução dos primeiros é muito menor, mas os Orbitraps, assim como os FTICR tem taxas de aquisição mais lentas, não sendo ainda totalmente compatíveis com as análises rápidas e de picos finos oferecidas pelos CLUE. Todavia, na maioria dos casos a sensibilidade do Orbitraps e FTICR é maior. Os Orbitraps tem ganhado espaço principalmente por ser um analisador de alta resolução com um custo de produção bem mais baixo que o dos TOF, principalmente em análises que não exigem resolução muito acima de 15000 ou 20000, que podem ser realizadas com ciclos de aquisição mais rápidos.

Os resultados demonstrados por Barrabin (2012) apontam a existência de uma variação grande na sensibilidade das curvas analíticas de métodos desenvolvidos em CLUE-TOF, provavelmente devido ao efeito da temperatura ambiente no tamanho do analisador, influenciando o tempo de voo dos íons e a resposta diferente fornecida pelo detector em relação ao dia anterior. O presente trabalho observou que as curvas analíticas construídas para o CLUE-TOF podem fornecer resultados confiáveis, apesar de não serem tão exatos quanto os produzidos por um QqQ. As variações encontradas por Barrabin na sensibilidade das curvas analíticas, somados à variações no efeito de matriz que pode ocorrer quando se analisa amostras diferentes apontam para uma importância da utilização de um padrão interno para fazer essas pequenas correções em análises quantitativas.

Guillarme e outros (2009) avaliaram o espalhamento das bandas extra coluna em CLUE e chegaram a conclusão de que, diferente de outros trabalhos, o design da fonte e da ótica interna dos EM pode ter grande impacto no alargamento dos picos, principalmente para picos com baixo D_m , chegando a 90 % de perda de eficiência para analitos pouco retidos em equipamentos EM mais antigos, sendo que os TOF são mais acometidos. Aparentemente, a contribuição interna das colunas para o alargamento das bandas é muito baixa, sendo que a tendência é a largura do pico se manter a mesma durante a análise, levando a um aumento de n para os picos com D_m maior por terem t_R mais elevado. O efeito inverso ocorre com moléculas com baixo D_m , onde a ação do espalhamento extra coluna vai ser muito mais significativo. Portanto, observa-se pelos resultados mostrados que uma limitação das análises rápidas é que só são possíveis sacrificando-se n . Nesse caso uma outra vantagem de se utilizar CLUE-TOF, ao invés de um acoplamento com CLAE é a alta eficiência de separação, que compensa o alargamento excessivo originado nas análises rápidas, e a alta seletividade dos EM de alta resolução que separa o sinal dos interferentes de mesma massa nominal que por ventura não tenham sido separados devido ao baixo t_R .

Os resultados mostram uma grande sensibilidade de todos os métodos (com exceção da análise de carotenoides, que foram analisados por injeção direta) desenvolvidos da ordem de ng/mL, mesmo com preparo de amostra simples. Isso demonstra o grande potencial da técnica de CLUE na eliminação do efeito de matriz, o que não ocorre na CLAE. Resultados semelhantes foram encontrados por Van de

Steene e Lambert (2008) em análises de água, amostra de complexidade bem menor do que alimentos. Maia (2013) e Araújo (2013), analisando amostras de urina e cabelo, também observaram uma enorme redução no efeito de matriz, nesse caso utilizaram colunas kinetex RP, core-shell em um CLAE. Esses últimos resultados, juntamente com os dados das análises de histamina e melamina, que foram realizadas na coluna Kinetex HILIC, do tipo core-shell, indicam que a redução significativa do efeito de matriz pode também ser alcançado nos sistemas CLAE se forem utilizadas colunas de ultra eficiência.

Os resultados obtidos com as análises de vinho, identificando de maneira rápida vários metabólitos secundários encontrados em pequenas quantidades, oriundos das uvas, e possivelmente do metabolismo das leveduras e bactérias participantes da fermentação, demonstra o grande potencial do CLUE-TOF para a metabolômica, área cujo objetivo principal é traçar o perfil químico de organismos. Nesses casos a presença de uma matriz complexa dificulta bastante as análises, e a utilização de uma análise e uma detecção de alta resolução são fundamentais para obtenção de resultados rápidos e confiáveis. Segundo Rodriguez-Aller e outros (2013) a substituição de um CLAE por um CLUE possibilita uma detecção 20 % maior de picos, justamente porque a maior eficiência na separação permite maior sensibilidade, por produzir picos mais finos, melhorando a razão sinal/ruído, e um menor volume morto após a separação diminui o alargamento dos picos após a separação evitando coeluições que prejudicam a identificação dos analitos e podem promover supressão de ionização.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que a técnica CLUE-TOF é adequada para utilização em análise de alimentos.

Foram desenvolvidos métodos de CLUE-TOF para análise de:

- Aflatoxinas em amendoim;
- Cloranfenicol em mel;
- Melamina em leite;
- Tetraciclina em leite;
- Histamina em vinho;
- Ácidos orgânicos e fenólicos em vinho e suco de uva;
- Retinol e
- Antocianinas.

Das proposições no capítulo Objetivos desta tese todas foram alcançadas, sendo que o desenvolvimento de método de análise de padrões cromatográficos de betacaroteno e zeaxantina por CLUE-TOF somente foi possível com injeção direta da amostra no TOF.

Os métodos desenvolvidos resultaram em análises ultra rápidas e com grande economia de solvente quando comparados com métodos da literatura.

Com exceção do método de análise de aflatoxinas, todos os métodos dispensaram a utilização de etapas de purificação da amostra com extração em fase sólida ou outras técnicas. A extração foi adaptada para utilização de solventes e soluções compatíveis com a EM por ESI e bastante simplificada. Também não foi necessário utilizar derivatização para viabilizar a separação ou a detecção.

Na análise de ácidos orgânicos e fenólicos de vinho e suco de uva foi possível identificar 44 substâncias entre ácidos orgânicos e compostos fenólicos, detectando a presença de isômeros, ésteres e glicosilações. Esse tipo de diferenciação não é realizado por outros métodos simples e rápidos em apenas uma corrida cromatográfica.

Todas as análises realizadas com os métodos desenvolvidos citados anteriormente forneceram dados rápidos e confiáveis de tempo de retenção e m/z de alta resolução sem a necessidade de preparo de amostra complexos, confirmando a

adequação da técnica e trazendo vantagens sobre as demais técnicas atualmente em uso.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Exportações Brasileiras de Carne Bovina. Brazilian Beef Export. Período: jan/2013 – dez/2013. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/41_exportacao_ano.asp> Acesso em: 10 jan. 2014.
- ALPERT, A. J. HILIC at 21: Reflections and Perspective. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.5879. 2011.
- ANDERSON, C. R.; RUPP, H. S.; WU, W. –H. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1075, p.23–32. 2005.
- ANLI, R. E. et al. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.53–62. 2004.
- AQUINO-NETO, F.R., SOUSA NUNES, D.S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro. 2003.
- ARAÚJO, A. S. **Desenvolvimento e validação de um método rápido para quantificação de cocaína e metabólitos em cabelo e urina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (CLAE-EM-EM)**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.
- ARZANDEH', S.; SELAMAT, J.; LIOE, H. Aflatoxin in Raw Peanut Kernels Marketed in Malaysia. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.18, n.1, p.44-50. 2010.
- BACH, B., et al. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p.114–119. 2012.
- BARRABIN, J. S. **Desenvolvimento, Validação e Acreditação de Ensaio Analítico de Determinação de Aflatoxinas em Amendoim por CLAE-EM/EM**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.
- BECKER, K. et al. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. **The Journal of the American Medical Association**, n. 285, p.1327-1330. 2001.
- BELTRAN et al. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Chemistry**, v.126, p.737–744. 2011.

BENOIT, B. et al. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p. 114-119. 2012.

BERNAL, J. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p.7438-7452. 2011.

BHAT; KOSMEDER II; PEZZUTO. Biological effects of resveratrol. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/ARS>> **Antioxidants & Redox Signaling**, v.3, n.6, p.1041–1064. 2001.

BIASOTO, A. C. T. et al. Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. **Food Quality and Preference**, v.21, p.755-762. 2010.

BOCXLAER, J. F. et al., Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Forensic Toxicology. **Mass Spectrometry Reviews**, v.19, p.165-214. 2000.

BOGUSZ, M. J. et al. Determination of morphine, M3G, and M6G, codeine, codeine-glucuronide and 6-MAM in body fluids by LC-APCI-MS, **Journal of Chromatography B**, v.703, p.115. 1997.

BORGES, E. M.; EUERBY, M. R. An appraisal of the chemical and thermal stability of silica based reversed-phase liquid chromatographic stationary phases employed within the pharmaceutical environment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.77, p.100-115. 2013

BOURGOGNE, E. et al. Simultaneous quantitation of histamine and its major metabolite 1-methylhistamine in rain dialysates by using precolumn derivatization prior to HILIC-MS/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.402, p.449–459. 2012.

BOWERS, L. D. High-performance liquid-chromatography mass-spectrometry - state of the art for the drug analysis laboratory. **Clinical Chemistry**, v.35, n.7, p.1282-1287. 1989.

BRASIL. ANVISA: AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Perguntas e Respostas sobre a adulteração do leite com melamina. 2008. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/300908_perguntas_respostas_sobre_melamina_final.pdf> Acesso em: 10 out. 2013.

BRASIL. ANVISA: AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. RESOLUÇÃO RDC Nº 72, DE 17 DE OUTUBRO DE 2008.

BRASIL. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 17, de 29 de Maio de 2013.

BRASIL. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO) **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, Rio de Janeiro, DOQ-CGCRE-008, 25p. 2010.

CAMPOS, R. S. **Estudo da Derivatização Pré-coluna com 6-aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato para Análise de Aminoácidos em Alimentos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

CARON, P. et al. Enzymatic Production of Bile Acid Glucuronides Used as Analytical standards for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analyses. **Molecular Pharmaceutics**, v.3, n.3, p.293-302. 2006.

CARPENTIERI, A.; MARINO, G.; AMORESANO, A. Rapid fingerprinting of red wines by MALDI mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p.969–982. 2007.

CATHARINO, R. R. et al. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.41, p.185-190. 2006.

CE. European Communities. **Official Journal of the European Communities** – Commission Decision (EC) of 12 Aug 2002, L 221/8. 2002.

CE. European Communities. **Official Journal of the European Communities** – Commission Regulation (EC) No 1000/98 of 13 May 1998, L 142/20. 1998.

CE. European Communities. **Official Journal of the European Communities** – Commission Regulation (EC) No 1881/96 of 19 Dec 1996, L 364/5. 1996.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Campinas: Unicamp. 2003.

CEJUDO-BASTANTE, M. J. et al. Combined Effects of Pre fermentative Skin Maceration and Oxygen Addition of Must on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics of Airén White Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.12171–12182. 2011.

CHAO, Y, -Y. et al. Using an on-line microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer. **Analitica Chimica Acta**, v.702, n.1, p.56-61. 2011.

CHÁFER-PERICÁS, C. et al. Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. **Food Control**, v.22, p.993-999. 2011.

CHEN, S.-H. et al. Pressure-induced retention of the lysozyme on reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.891, p.207-215. 2000.

CHENG, W. -C. et al. Determination of urine melamine by validated isotopic ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p1776-1782.2009.

CHROMACADEMY. Disponível em <<http://www.chromacademy.com/essential-guide/dec2011/figure-12.jpg>> Acesso em 20 fev. 2013.

CHROMSERVIS. **Core-shell technology: Kinetex™ Ultra-High Performance on Any LC System**. Disponível em: <http://chromservis.cz/item/core-shell-technology?lang=EN> Acesso em 24 mar. 2013.

COLLINS, C. H. Princípios de Cromatografia. In: UNICAMP (Ed.) **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. Campinas, 1997. p.11-27.

COLLINS, C. H.; AQUINO NETO, F. R.; SILVA, J. R. P. Terminologia em Cromatografia. Parte I. Vocabulário para Cromatografia. **Química Nova**, v.11, n.4, p.443-464. 1988.

COLLINS, C. H.; AQUINO NETO, F. R.; SILVA, J. R. P. Terminologia em Cromatografia. Parte II. Símbolos para Cromatografia. **Química Nova**, v.12, n.1, p.92-94. 1989.

CROTTI et al. LC-Hyphenated Techniques: Uses in the Structural Elucidation of Low and High Molecular Weight Compounds. In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry, C.A. Taft, **Signpost Research**, Kerala, India, p. 1-43, 2006.

DANG, A.; PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system. **Food Chemistry**, v.141, p.4226-4230. 2013.

DA SILVA, J. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de resíduos do antibiótico cloranfenicol em diferentes matrizes alimentícias**. Salvador, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal da Bahia, 2009.

DA SILVA, J. R.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino

por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). **Química Nova**, v.33, n.1, p.90-96. 2010.

DA SILVA, R. J. N. B.; CAMÕES, M. F. The Quality of Standards In Least Squares Calibrations. **Analytical Letters**, v.43, p.1257–1266. 2010.

DIAS, J. F. **Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos de duas regiões brasileiras**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

DIAS, S. S. **Detecção de Adulteração de Leite e Derivados de Leite de Búfala por Análise de Vitamina A e beta caroteno**. Seropédica, 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio e Janeiro, 2012.

DOLAN, J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer selection. **ACE HPLC columns**. Disponível em: <http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf> Acesso em: 18 dez. 2013.

DWYER, J. T. Future directions in food composition studies. **Journal of Nutrition**. v.124, n.9, p.1783S-1788S. 1994.

ECONOMIA IG. Brasil quer evitar efeito dominó de embargos à carne. **Economia IG**. 13 Dez. 2012. Disponível em: <<http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio/2012-12-13/brasil-quer-evitar-efeito-domino-de-embargos-a-carne.html>> Acesso em: 10 jan. 2013.

ECONOMIA UOL. Rússia suspende importação de carne de dez frigoríficos brasileiros. 25 set. 2013. **Economia UOL**, São Paulo. Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/agronegocio/noticias/redacao/2013/09/25/russia-suspende-importacao-de-carne-de-dez-frigorificos-brasileiros.htm>> Acesso em: 10 out. 2013.

ETTRE, L. S. Nomenclature for Chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v.65, n.4, p.919-872. 1993.

ETTRE, L. S. M. S. Tswett and the Invention of Chromatography. **LCGC North America**, v.21, n.5, p.458-467. 2003.

EVANS, C. E.; DAVIS, J. A. Effect of Pressure-Induced Ionization, Partitioning, and Complexation on Solute Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.397, p.163-172 .1999.

FALLAS, M. M. et al. Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1217,

p.276-284. 2010.

FARIA, A. M. et al. Fases Estacionárias Monolíticas para Separações Cromatográficas, **Química Nova**, v.29, n.2, p.300-309.2006.

FDA. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. **U.S. Food and Drug Administration**. 2012. 2 ed. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>> Acesso em: 15 jul. 2012.

FDA. Compliance Program Guidance Manual, National Drug Residue Milk Monitoring Program, Section 7303.039. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1997.

FEI, H. E. et al. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. **Molecules**, v.17, p.1571-1601.2012.

FEKETE, S.; OLAH, E.; FEKETE, J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. **Journal of Chromatography A**, v.1228, p.57– 71. 2012.

FEKETE, S.; GANZLER, K.; FEKETE, J. Efficiency of the new sub-2 core-shell (Kinetex) column in practice, applied for small and large molecule separation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p.482-490. 2011.

FEKETE, S.; FEKETE, J.; GANZLER, K. Shell and small particles; Evaluation of new column technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.64–71. 2009.

FELINGER, A.; BOROS, B.; OHMACHT, R. Effect of pressure on retention factors in HPLC using a non-porous stationary phase. **Chromatographia**, v.56, p.S61-S64. 2002.

FENN, J. B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.13, n.3, p. 101-118. 2002.

FENN, J. B. e RUTAN, S. C. Preface. **Analytica Chimica Acta**, v.406, p.1. 2000.

FLAMINI, R. Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v.22, p.218-250. 2003.

FLAMINI, R. et al. An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. **Metabolomics**, v.9, p.1243–1253. 2013.

FOLHA. China detecta melamina em leite líquido de 3 três marcas. **Folha de São**

Paulo, Folha online: Mundo. 19 set. 2008. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mundo/2008/09/446615-china-detecta-melamina-em-leite-liquido-de-tres-marcas.shtml>> Acesso em: 11 nov. 2008.

FOUNTAIN, K. J. et al. Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2-microm porous particles. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.5979-88. 2009.

GALEANO-DÍAZ, T; DURÁN-MERÁS, I.; AIRADO-RODRÍGUEZ, D. Isocratic chromatography of resveratrol and piceid after previous generation of fluorescent photoproducts: Wine analysis without sample preparation. **Journal of Separation Science**, v.30, p. 3110-3119. 2007.

GARCEZ, B. Produtores reclamam de embargo 'alamista' à carne brasileira. **BBC Brasil**. 14 dez. 2012. Disponível em: <http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2012/12/121212_embargo_carne_lk.shtml> Acesso em: 10 jan. 2013.

GIDDINGS, J. C. Comparison of Theoretical Limit of Separating Speed in Gas and Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v.37, p.60-63. 1965.

GIDDINGS, J. C. 'Eddy' Diffusion in Chromatography. **Nature**, v.184, p.357. 1959.

GÓMEZ-ROMERO, M. et al. Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. **Food Chemistry**, v.124, p.379–386. 2011.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.1, p.43-46. 2012.

GRIMALT, S.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J.; HERNÁNDEZ, F. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, p.421-436, 2010.

GRITTI, F. et al. Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.1589-1603. 2010.

GRITTI, F. et al. Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.3000-12. 2010.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Mass transfer equation for proteins in very high-pressure liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v.81, p.2723-2736. 2009.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency. **Journal of Chromatography A**, v.1221, p.2-40. 2012.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm I.D. columns packed with sub-2 μm particles. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.7677-89. 2010.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Peak Shapes of Acids and Bases under overloaded Conditions in Reversed-phase Liquid Chromatography, with Weakly Buffered Mobile Phases of Various pH: a Thermodynamic Interpretation. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 63-78. 2009.

GUARANTINI, T. et al. New chemical evidence for the ability to generate radical molecular ions of polyenes from ESI and HR-MALDI mass spectrometry. **Analyst**. v.129, p.1223-1226. 2004.

GUILHARME, D. et al. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n.1, p.15-27. 2010.

GUILHARME, D. et al. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic end gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3232-3243. 2009.

GUILLARME, D. et al. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, p.475-482. 2007.

GUILHARME, D.; VEUTHEY, J. L. State-of-the art of (UHP)LC–MS(–MS) techniques and their practical application. **Journal of Chromatography A**, v.1292, p.1. 2013.

HALASZ, A. et al. Biogenic-amines and their production by microorganism in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v.5, n.2, p.42-49. 1994.

HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. **Journal of Chromatography B**, v.879, n. 17-18, p. 1270-1281. 2011.

HONORÉ, A. H.; THORSEN, M.; SKOV, T. Liquid chromatography–mass spectrometry for metabolic footprinting of co-cultures of lactic and propionic acid bacteria. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.405, p.8151–8170. 2013.

HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v.39, n.12, p.1422-1428. 1967.

IKEGAMI, T. et al. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 474-503. 2008.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.692, p.1–25. 2011.

JIA, S. et al. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.9174– 9182. 2012.

JÚNIOR, H. A. M. et al. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v.29, n.3, p.586-592. 2006.

KAHSAY, G. et al. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.87, p.142-154. 2014.

KAUFMANN, A. et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC–TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.13–21. 2007.

KOPPENAAL et al. MS Detectors. **Analytical Chemistry**, v.77, n.21, p.418–427. 2005.

KORE Technology Introduction to Time-of-flight Mass Spectrometry. **Disponível em:** <<http://www.kore.co.uk/tutorial.htm>> Acesso em 17 fev.2013.

KUBICA, P. et al. “Dilute & Shoot” approach for rapid determination of trace amounts of nicotine in zero-level e-liquids by reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interactions liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1289, p. 13-18. 2013.

KUMAR, A., HEATON, J. C., MCCALLEY, D. V. Practical investigations of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1276, p.33-46. 2013.

LABEXCHANGE Finnigan SSQ 710. Disponível em: <<http://www.labexchange.com/de/laborgeraete-kaufen/d/?sn=08797>> Acesso em 14 abr. 2013.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass Spectrometry Applied to Liquid Chromatographic Analysis of Pesticides in Water and Food. **Mass Spectrometry Reviews**, v.25, p.866-880. 2006.

LAM, P. M. W. et al. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. **Analytical Biochemistry**, v.380, p.195-201. 2008.

LANDETE, J. M. et al. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1119-1124. 2005.

LASERCHROM. HPLC Equipment: Model 7725i Rheodyne Manual Injection Valve. Disponível em: <<http://www.laserchrom.co.uk/valve.htm>> Acesso em: 13 fev. 2013.

LÁZARO DE LA TORRE, C. A. **Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de aminas biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves**. Niteroi, 2013. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) Universidade Federal Fluminense, 2013.

LI, Y. et al. Optimization of Extraction and Determination of Chloramphenicol in Livestock Meat Samples using Aqueous Two-Phase System of *n*-propanol and Potassium Citrate Coupled with HPLC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n.4, p.669-674. 2013.

LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxinas. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.9, p.1115-1126. 2009.

LINDEN, J. C., LAWHEAD, C. L. Liquid chromatography of saccharides. **Journal of Chromatography A**, v.105, p.125-133. 1975.

LIU, X. et al. Influence of pressure on the chromatographic behavior of insulin variants under nonlinear conditions. **Journal of Chromatography A**, v.988, p.205-218. 2003.

LÓPEZ, F. J. G.; QUEREDA, C. Melamine toxicity: one more culprit in calcium kidney lithiasis. **Kidney International**, v.80, p.694-696. 2011.

MACEDO, D. Estados Unidos retiram embargo à carne processada brasileira. 24 Dez. 2010. **Agência Brasil**. Disponível em: <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2010-12-24/estados-unidos-retiram-embargo-carne-processada-brasileira>> Acesso em 10 jan. 2011.

MAGNET Lab. The Center of Integrating Research and Learning. Mass Spectrometer. Disponível em: <<http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/magnetminute/spectrometer-transcript.html>> Acesso em 16 jun. 2013.

MAIA, C. S. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para análise de THC e THC-COOH na urina utilizando resina de troca aniônica através da técnica de CLAE-EM**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p.214-222. 2009.

MARCHI, I. et al. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. **Journal of Chromatography A**. v.1217, p.4071-4078. 2010.

MARCOBAL, A. et al. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. **Journal of Food Protection**. v.69, n.2, p.397-404. 2006.

MARTIN, M.; EON, C.; GUIOCHON, G. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography: I. theoretical analysis. **Journal of Chromatography A**, v.99, p.357-376. 1974.

MCCALLEY, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? **Journal of Chromatography A**, v.1171, p.46-55. 2007.

MCCALLEY, D. V. Instrumental considerations for the effective operation of short, highly eficiente fused-core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.4561-4567. 2010.

MCGUFFIN, V. L.; CHEN, S. H. Theoretical and Experimental Studies of the Effect of Pressure on Solute Retention in Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v.69, p.930-943. 1997.

MCGUFFIN, V. L.; CHEN, S. H. Direct Examination of Separation Processes in Liquid Chromatography: Effect of Temperature and Pressure on Solute Retention. **Journal of Microcolumn Separations**, v.5, p.3-10. 1993.

MEISEN, I. et al. Normal silica gel and reversed phase thin-layer chromatography coupled with UV spectroscopy and IR-MALDI-o-TOF-MS for the detection of tetracycline antibiotics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.398, p.2821–2831. 2010.

MONZIR-PAL.NET. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Disponível em: <http://www.monzir-pal.net/Instrumental%20Analysis/Contents/HPLC_CH28.htm> Acesso em: 10 jan. 2013.

MS4SALE: HPLC, GC & MS Instruments with warranty. **Gilson HPLC & GC for sale**. Disponível em: <<http://www.ms4sale.co.uk/hplc-gc/?man=Gilson>> Acesso em: 10 jan. 2013.

MTL. Massachusetts Institute of Technology. **Quadrupole Mass Filters**. Disponível em: <<http://www-mtl.mit.edu/wpmu/lfv/research/miniaturized-analytical-components-and-systems/quadrupole-mass-filters>> Acesso em 24 fev. 2013

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95–111. 2004.

NIESSEN, W. M. A.; TINKE, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p.37-57.1995.

NIESSEN, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.856, p.179-197. 1999.

NIESSEN, W. M. A. Liquid chromatography-mass spectrometry. 3rd ed. Taylor & Francis. Flórida. 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**. v.68, p.908-918. 2006.

OHMACHT, R.; BOROS, B. Effect of pressure on solute capacity factor in HPLC using a non-porous stationary phase. **Chromatographia**. v.51, p.S205-S210. 2000.

OLÁH, E. et al. Comparative study of new shell-type, sub-2 μ m fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. **Journal of**

Chromatography A, v.1217, p.3642-3653. 2010.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade de parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Seropédica, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,, 2009.

PAIXÃO, N. et al. Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. **Journal of Separation Science**. v.31, n.12, p.2189-2198. 2008.

PALMER, J. K. A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography. **Analytical Letters**. v.8, p.215-224, 1975.

PENA, A. et al. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.18, p.839–845. 1998.

PEÑA-GALLEGO, A. et al. Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: a comparative study. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.3398-3401. 2009.

PERIAT, A. et al. Screening of the most relevant parameters for method development in ultra-high performance hydrophilic liquid interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1282, p.72-83. 2013.

PEZZA, L. et al. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tiamfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínica micelar. **Química Nova**, v.29, n.5, p.926-931. 2006.

POMBO, C.R. et al. **Desenvolvimento de Novo Método de Análise de Histamina, Putrescina e Cadaverina por CLAE Utilizando Derivatização com 6-Aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato (AQC)**. Trabalho apresentado no 3º Simpósio de Segurança Alimentar, Florianópolis, SC, 2010.

PONTON, L. M. et al. Liquid chromatographic separations with mobile-phase additives: influence of pressure on coupled equilibria. **Analytical Chemistry**, v.72, p.3581-3589. 2000.

POPPE, H. Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, v.778, p.3-21. 1997.

PRESTES, O. D. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v.30, n.1, p.18-21. 2007.

PUÉRTOLAS, E. et al. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. **Food Chemistry**, v.119, p.1063–1070. 2010.

RASFF. Rapid Alert System for Food and Feed. **European Commission**. 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm> Acesso em: 10 jan. 2014.

RAUSCHER-GABERNIG et al. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. **Food Control**, v.20, p.423-429. 2009.

ROBERTO. Química de Produtos Naturais. Sobre Química de Produtos Naturais, Ciência, Política Científica. **Separações por HPLC – I – cuidados**. Disponível em: <<http://quipronat.wordpress.com/2009/05/21/separacoes-por-hplc-i-cuidados/>> Acesso em: 20 jan. 2013.

RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**, v.1292, p.2-18. 2013.

RODZIEWICZ, L.; ZAWADZKA, I. Rapid Determination of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and the Validation of Method Based on 2002/657/EC. **APIACTA**. v.42, p.25-30. 2007.

SAURINA, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry**. v.39, n.3, p.234-245. 2010.

SCHULZ, D.F. **Desenvolvimento de Método Rápido de Análise de Histamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Atum**. Seropédica, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

SCINER: Microchannel Plates and Microchannel Plate Detectors. Disponível em: <<http://www.sciner.com/MCP/MCP.htm>> Acesso em 25 mar. 2014.

SHALABY, A. R. et al. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. **Food Chemistry**, v.124, p.1660–1666. 2011.

SHEIBANI, A.; GHAZIASKAR, H. S. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B1 and B2 from pistachio. **Food Control**, v.20, p.124–128. 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F, X;; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora LTC, Rio de Janeiro 2007.

SMOKER, M.; KRYNISTKY, A.J. Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version 1.0. LIB 4422 Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods. FDA: Laboratory Information Bulletin, N. 4422, oct. 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071673>> Acesso em: 11 nov. 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND. J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2ed. New York: John Wiley & Sons.1979.

SOUZA et al. Bioactive amines in Brazilian wines: types, levels and correlation with physic-chemical parameters. **Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal**. v.48, n.1, p.53-62. 2005.

SOVAK, M. Grape Extract, Resveratrol and its Analogs: a Review. **Journal of Medicinal Food**, v.4, n.2, p.93-105. 2001.

SPAGGIARI, D. et al. Contribution of various types of liquid chromatography–mass spectrometry instruments to band broadening in fast analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1310, p.45– 55. 2013.

STADALIUS, M. A; GOLD, H. S.; SNYDER, L. R. Optimization model for the gradient elution separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Verification of retention relationships. **Journal of Chromatography A**, v.296, p.31-59. 1984.

SUN, H. et al. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. **Food Control**, v.21, p.686-691. 2010.

SU, X. et al. Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.338, p.39–44. 2013.

THERMO Scientific LTQ Orbitrap. Disponível em: <<http://www.thermoscientific.fr/com/cda/product/detail/1,10131071,00.html>> Acesso em 13 jan. 2013.

TIAN, Y. et al. Comparison of three methods for detection of melamine in compost and soil. **Science of the Total Environment**, v.417-418, p.255-262. 2012.

TOLSTIKOV, V. V.; FIEHN, O. Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin:

Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.301, p.298-308. 2002.

VAIL, T. M.; JONES, P. R.; SPARKMAN, O. D. Rapid and Unambiguous Identification of Melamine in Contaminated Pet Food Based on Mass Spectrometry with Four Degrees of Confirmation. **Journal of Analytical Toxicology**, v.31, p.304-312. 2007.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**. v.5, p.271–289. 1956.

VAN DE STEENE, J. C.; LAMBERT, W. E. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. **Journal of Chromatography A**, v.1182, n.2, p.153-160. 2008.

VEJA. China tem novo caso de leite contaminado com melamina. **Veja: Internacional**. 22 nov. 2010. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/internacional/china-tem-novo-caso-de-leite-contaminado-com-melamina>> Acesso em: 20 dez. 2010.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1875-1887. 2011.

VIDAL-CAROU, M. C.; CODONY-SALCEDO, R.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in spanish wines: Relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-latic fermentation intensity. **Food Chemistry**. v.35, n.3, p.217-227. 1990.

VOSOUGH, M.; BAYAT, M.; SALEMI, A. Matrix-free analysis of aflatoxins in pistachio nuts using parallel factor modeling of liquid chromatography diode-array detection data. **Analytica Chimica Acta**. v.663, p.11–18. 2010.

VRIES GROUP. FT- ICR. Disponível em: <<http://web.chem.ucsb.edu/~devries/groupsite/labicr.htm>> Acesso em: 18 mar. 2013.

WALTKING, A. E.; WILSON, D. Liquid Chromatographic Analysis of Aflatoxin Using Post-Column Photochemical Derivatization: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.89, n.3, p.678-692. 2006.

WASILA, H. Peel Effects on Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and Making of Pomegranate Juice and Wine. **Journal of Food Science**, v.78, n.8, p.1166-1172. 2013.

WATERS. Solvents and Caveats for LC/MS. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/en_US/Solvents-and-Caveats-for-LC-MS/nav.htm?cid=10091173> Acesso em 10 jan. 2013.

WHO. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **WHO Food Additives Series n° 53**. Geneva, 2004. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

XU, J. -Z. et al. Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.868, p.42–48. 2008.

XU, Y. et al. Preparation of magnetic strong cation exchange resin for the extraction of melamine from egg samples followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.661, p.35–41. 2010.

YAMASHITA, M. e FENN, J. B. Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source. **The Journal of Physical Chemistry**, v.88, p.4611-4615. 1984.

YU, H. et al. Development of an HPLC–UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction. **Food Chemistry**, v.124, p.1131–1138. 2011.

ZILIOOTTO, P. M. et al. Perfil analítico do método de extração para a detecção de tetraciclina por CLAE-DAD em leite bovino. **Higiene Alimentar**. v.25, p.627-629. 2011.