



PREPARO DE PADRÕES ANALÍTICOS DE ALTA PUREZA USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ESCALA ANALÍTICA.

S. Pacheco¹, R.L.O. Godoy¹, J. Oiano-Neto¹, M.C.P. Araujo¹, J.S. Rosa¹, R.G. Borguini¹, I. Felberg¹, A.C.M.S. Gouvêa².

1-Laboratório de Cromatografia Líquida - Embrapa Agroindústria de Alimentos – endereço

2-Pós-graduação Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO – A obtenção de padrões com alta pureza e confiabilidade é certamente a maior dificuldade e fonte de erros na química analítica. Este trabalho teve por objetivo demonstrar a possibilidade de se obter substâncias em alta pureza e em quantidades suficientes para a utilização como padrões analíticos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de maneira rápida e com o uso do próprio cromatógrafo analítico. Foram isolados padrões de três classes de substâncias: isoflavonas, antocianinas e carotenóides, a partir das próprias matrizes a serem quantificadas.

ABSTRACT – Achieving standards with high purity and reliability is certainly the greatest difficulty and source of errors in analytical chemistry. This study aimed to demonstrate the feasibility of obtaining substances with high purity and in sufficient quantities for use as standards in analytical HPLC, quickly and with the use of analytical chromatograph equipment. Standards of three classes of compounds were isolated: isoflavones, anthocyanins and carotenoids, from their own matrixes to be quantified.

PALAVRAS-CHAVE – CLAE; carotenóides; isoflavonas; antocianinas.

KEYWORDS - HPLC; carotenoids; isoflavones; anthocianines.

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores dificuldades na análise quantitativa por CLAE é a obtenção de padrões analíticos confiáveis. A padronização é certamente a maior fonte de erros analíticos, pois impacta diretamente no resultado final. A aquisição de padrões de alta pureza, com certificado de garantia, quase sempre depende de importação e apresenta custos elevados. Em alguns casos, as substâncias que se deseja quantificar sequer estão disponíveis comercialmente.

Em geral os padrões são comercializados em pequenas quantidades, o que inviabiliza a análise qualitativa e a verificação de sua pureza, passos fundamentais para a garantia dos resultados analíticos obtidos quando da utilização de tais substâncias para padronização.

As condições de armazenamento também são críticas para a manutenção da estabilidade química dos padrões, em especial se tratando de substâncias instáveis. Assim sendo, o processo de importação, normalmente demorado é também fonte de incerteza na garantia da qualidade da substância adquirida mesmo em se tratando de empresa de renome e com certificado de análise, pois ainda há o risco da substância estar comprometida devido a condições inadequadas de transporte e manuseio.

É possível obter-se curvas de calibração com ótimos coeficientes lineares, resultados reprodutíveis e precisos, porém com a exatidão comprometida, no caso de se utilizar substância



degradada na padronização. E ainda, os produtos de degradação dos padrões podem não ser detectados pela metodologia empregada.

A preparação dos padrões no próprio laboratório de análise é uma alternativa e a cromatografia preparativa, em coluna aberta ou em sistemas cromatográficos preparativos, pode ser utilizada para este fim. Grandes quantidades de padrões com purezas elevadas podem ser obtidas, no entanto a técnica requer equipamentos de alto custo, no caso dos sistemas preparativos, além de demandarem grande quantidade de solventes e, principalmente, tempo.

Para a construção de curvas de calibração externas em CLAE, o padrão preparado ou adquirido é pesado e em seguida diluído para várias concentrações que compõem a faixa de trabalho do método. No entanto, as quantidades efetivamente injetadas no sistema cromatográfico são em geral da ordem de ng ou até pg (10^{-6} g).

O objetivo deste trabalho é demonstrar a possibilidade de se obter padrões analíticos de maneira rápida, fácil, em quantidade suficiente e com altíssima pureza utilizando a CLAE em escala analítica, com detecção não destrutiva. Sendo viável ainda, obter tais padrões a partir das próprias matrizes analisadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia de isolamento por CLAE foi aplicada para o preparo de padrões analíticos de três classes de substâncias: isoflavonas, carotenóides e antocianinas. Todos os padrões preparados foram obtidos usando um cromatógrafo analítico Alliance® 2695 Waters, com detector de arranjo de fotiodos 2996 Waters e uma válvula de 6 vias da Rheodyne®, acoplada à saída do detector. As substâncias de interesse foram coletadas na saída do detector ao eluirm, o que foi feito manualmente ou com a utilização da válvula seletora comandada pelo software Empower® (Figura 1).

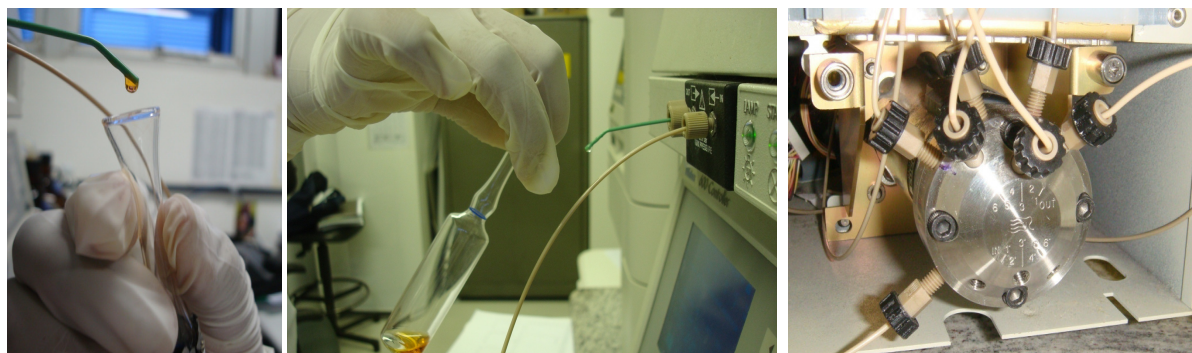


Figura 1 – Coleta manual de carotenóide na saída do detector DAD e a válvula coletora.

A válvula seletora foi configurada de maneira que a posição 1 destina o efluente do detector para o descarte, e as posições 2 a 6 para cinco frascos coletores (Figura 2). Nesta configuração é possível a coleta de até cinco substâncias em cada injeção cromatográfica de maneira automática.

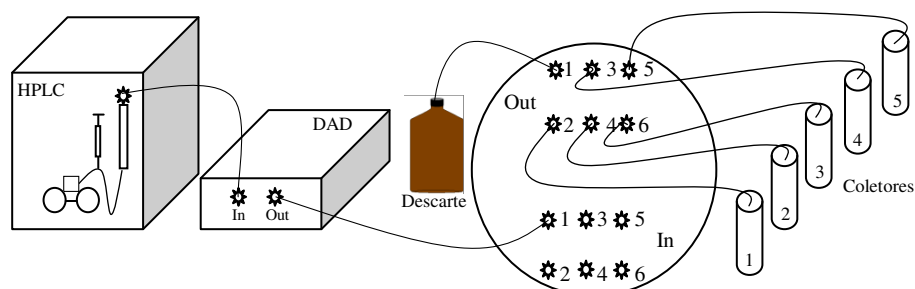


Figura 2 – Esquema do sistema cromatográfico com a válvula seletora.



Padrões de isoflavonas foram obtidos a partir de extrato metanólico de germen (hipocótilo) triturado. O extrato foi concentrado e as isoflavonas separadas por CLAE em coluna C_{18} com gradiente de eluição de metanol em água. A válvula Rheodyne foi utilizada para a coleta automática de três picos correspondentes às isoflavonas glicosídicas daidzina, glicitina e genistina.

No preparo dos padrões de antocianinas, foi utilizado extrato metanólico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Foram isolados dois picos referentes às antocianinas: cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo.

Para a obtenção de padrões de carotenóides foram utilizadas as seguintes matrizes: cenoura para o preparo dos padrões de α -caroteno e β -caroteno; polpa de cajá (*Spondias mombin* L.) para o preparo dos padrões de β -caroteno, β -criptoxantina e zeinoxantina e alface para o isolamento dos isômeros trans- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno. Os extratos concentrados dos carotenóides foram separados em coluna analítica C_{30} e os carotenóides coletados manualmente ao eluírem do detector.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 apresenta os cromatogramas e os espectros UV/Vis das três isoflavonas glicosídicas isoladas, daidzina (99,85%), glicitina (99,94%) e genistina (99,95%).

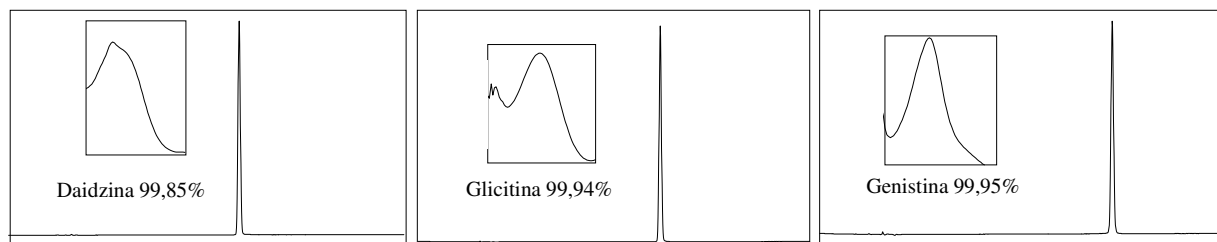


Figura 3 – Cromatogramas e espectros UV/Vis das isoflavonas isoladas.

A Figura 4 apresenta os cromatogramas e os espectros UV/Vis das duas antocianinas isoladas de açaí, cianidina-3-glicosídeo (96,0%) e cianidina-3-rutinosídeo (97,5%).

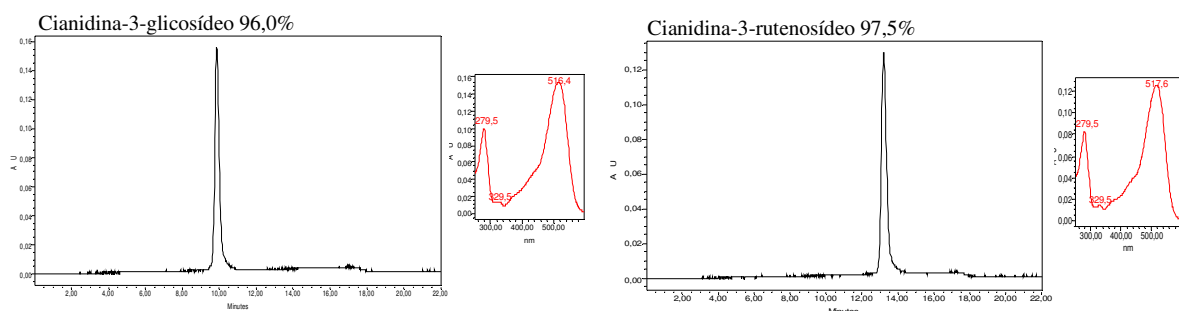
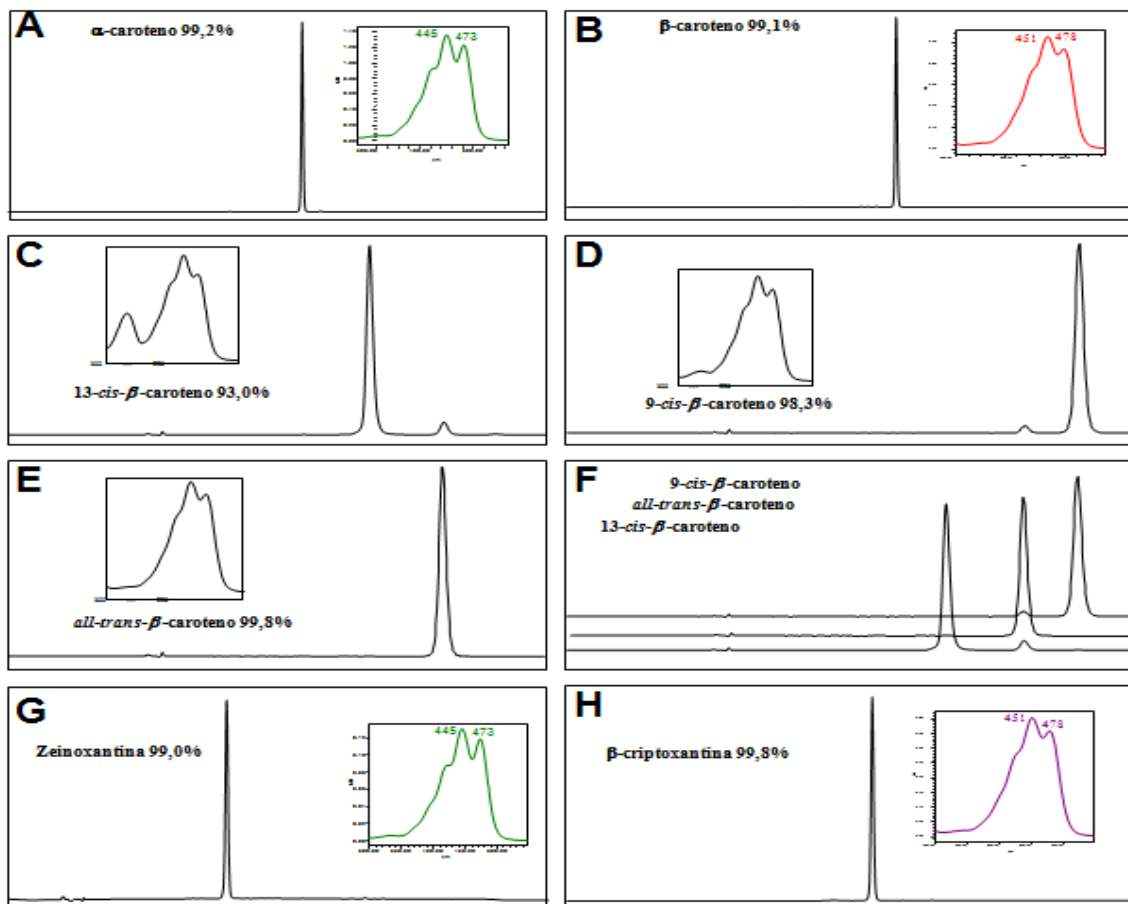


Figura 4 – Cromatogramas e espectros UV/Vis das antocianinas isoladas.

Com cinco injeções de $15\mu\text{L}$ do extrato concentrado de cenoura foram obtidos $16,5\mu\text{g}$ de α -caroteno e $19,6\mu\text{g}$ de β -caroteno, com pureza de 99,2 e 99,1% respectivamente (Figura 5 A e B). Da alface foram obtidos os isômeros 9-*cis*- β -caroteno (98,3%), 13-*cis*- β -caroteno (93,0%) e all-trans- β -caroteno (99,8%) (Figura 5 C, D, E e F). Do cajá obteve-se β -criptoxantina com 99,8% de pureza e zeinoxantina com 99,0% Figura 5 G e H).



4. CONCLUSÃO

Utilizando-se CLAE em escala analítica foi possível preparar padrões analíticos de três isoflavonas, duas antocianinas e cinco carotenóides, incluindo isômeros, no próprio laboratório de maneira rápida e simples.

5. REFERÊNCIAS

PACHECO, Sidney. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Seropédica: UFRRJ, 2009. 106p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos).

GODOY, R. L. de O.; FELBERG, I.; PACHECO, S.; MIGON, J. de F.; OLIVEIRA, E. F. de Obtenção de padrões primários e secundários de isoflavonas a partir de hipocótilos de soja (*Glycine max* L. Merril). Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química: Químicos para uma potência emergente.

GOUVEA, A. C. M. S.; ARAUJO, M.C.P. de; PACHECO, S.; OIANO NETO, J.; GODDOY, R. L. de O.; ROSA, J.S. da Cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside anthocyanins standards isolation by HPLC from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) III Cingreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos