

(11) *Número de Publicação:* **PT 89308 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

G01N025/14 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1988.12.22

(30) *Prioridade:* 1987.12.22 US 136696

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.12.29

(45) *Data e BPI da concessão:*
05/93 1993.05.20

(73) *Titular(es):*

KRAFT INC.
KRAFT COURT GLENVIEW ILLINOIS 60025 US

(72) *Inventor(es):*

JEREMY J. MATHERS US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE PARTIÇÃO DE VOLÁTEIS ORGÂNICOS E APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DO MESMO

(57) *Resumo:*

[Fig.]

"Processo de partição de voláteis orgânicos e aparelho para a realização do mesmo"

para que

KRAFT, INC., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de partição e análise de voláteis aromatizantes e outros componentes orgânicos em composições alimentares ou de biocultura, utilizando misturas de acetonitrilo e água que são arrefecidas de modo a obter a separação das fases e dos componentes.

O invento refere-se ainda a um aparelho para a realização do referido processo.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVAAntecedentes do invento

O presente invento refere-se a processos e aparelho para análise de componentes orgânicos voláteis aromatizantes de produtos alimentares. Mais particularmente o presente invento refere-se a processos e aparelho para extração com separação de fases e análise qualitativa ou quantitativa dos compostos voláteis orgânicos aromatizantes de materiais biológicos, tais como produtos alimentares.

Os compostos voláteis aromatizantes, particularmente incluindo compostos orgânicos voláteis aromatizantes, relativamente não polares, contendo menos de 15 átomos de carbono compreendendo pelo menos um elemento indutor de polarização (por exemplo, oxigénio, enxofre ou azoto), são geralmente bem conhecidos como constituintes importantes dos produtos alimentares, que podem afectar profundamente ou subtilmente a sua palatibilidade e características organolépticas. Quantidades muito pequenas de componentes voláteis aromatizantes têm um efeito extremamente importante no aroma e palatibilidade de produtos alimentares. Como tal, na preparação ou nos testes de produtos alimentares convencionais, tal como no desenvolvimento de produtos alimentares novos, é desejável analisar os produtos alimentares, quer quantitativamente quer qualitativamente, no que diz respeito a compostos voláteis aromatizantes. Contudo, a análise quantitativa e/ou qualitativa dos compostos voláteis aromatizantes nos produtos alimentares, tais como lacticínios, é difícil devido à quantidade extremamente pequena de tais compostos nos produtos alimentares e ao alto teor de materiais potencialmente interferentes nos produtos alimentares. Deste modo, por exemplo, produtos alimentares tais como lacticínios podem conter tipicamente proporções importantes de componentes tais como gorduras, proteínas, aminoácidos e sais que mascaram, diluem ou de outra maneira interferem com a análise dos voláteis aromatizantes.

Convencionalmente, utilizam-se vários processos de extração para compostos orgânicos voláteis aromatizantes na análise do

-3-

aroma e fragrância e em estudos clínicos. São correntemente utilizadas destilação ou retenção de compostos voláteis usando materiais adsorventes, ou separação da fase orgânica usando dicloro-uretano ou outros solventes correntemente utilizados, cada um com as correspondentes vantagens e desvantagens. Deste modo, por exemplo, um método para análise dos compostos voláteis aromatizantes em queijos envolve a cominuição das amostras de queijo com um substrato de enchimento, tal como um substrato de argila, de modo a formar uma mistura íntima de substrato-queijo e o empacotamento da mistura numa coluna para extração subsequente. Pode passar-se acetonitrilo puro através da coluna sendo os componentes aromatizantes extraídos para o acetonitrilo [N.P. Wong, et al., J. Dairy Sci., 51 (1968) 1768-69].

Existem muitos factores químicos e físicos envolvidos na avaliação dos fenómenos de extração por partição [A. Leo, et al., Chemical Reviews, 71 (1971) 525-616; H. Walter, et al., Anal. Biochem. 155 (1986) 215-242]. A partição de fases através de misturas de acetonitrilo, água e clorofórmio tem sido usada para extrair complexos corados da molibdofosfato para determinações colorimétricas em análises de materiais inorgânicos não aromatizantes [Fujinaga, T., et al., "Study of Solvent Synergism for the Selective Extraction. IV.", Bunseki Kagaku, Vol. 33 (3), pp. 159-164 (1984)]. Contudo, tais técnicas não têm sido aplicadas à análise quantitativa ou qualitativa de voláteis aromatizantes em produtos alimentares; mais ainda, o uso de clorofórmio pode interferir com os picos, conhecidos ou não conhecidos, de voláteis aromatizantes. Tem-se usado cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) para identificar e quantificar compostos orgânicos tais como os voláteis de enxofre [A. Tangerman, et al., Clin. Chim. Acta, 130 (1983) 103-110; A. Tangerman, J. Chromatogr., 366 (1986) 205-216; J.A. Cox, et al., Anal. Lett., 10 (1977) 869-885], sendo a GC preferida para a determinação de níveis muito reduzidos desses compostos. Os tempos de retenção em HPLC em fase inversa têm sido usados para correlacionar os coeficientes de partição de n-octanol/água [C.V. Eadsforth, Pest. Sci., 17 (1986) 311-325] de muitos compostos. No

-4-

entanto, enquanto as técnicas analíticas de GC e HPLC estão bem desenvolvidas o que é adequado para a detecção e quantificação de compostos orgânicos específicos, os processos convencionais para preparação de amostras alimentares e extração de compostos voláteis aromatizantes têm desvantagens significativas.

São desejáveis novos processos para análise de compostos orgânicos voláteis aromatizantes que proporcionam a extração eficaz e conveniente de compostos voláteis aromatizantes dos produtos alimentares e ao mesmo tempo minimizem os componentes interferentes ou mascarantes e é um objecto do presente invento proporcionar tais processos. São também desejáveis novos processos para a extração de componentes polares seleccionados de fermentações biológicas sendo também um objecto do presente invento proporcionar tais processos. É ainda um objecto do invento proporcionar processos automatizados para análise de componentes orgânicos aromatizantes que possam ser fácil e convenientemente usados em sistemas de teste analíticos repetitivos. Estes e outros objectos do invento serão evidentes a partir da descrição detalhada seguinte e dos desenhos que a acompanham.

Descrição dos desenhos

As Figuras 1a, 1b e 1c são ilustrações esquemáticas de aparelhagem analítica adequada para análise automatizada de voláteis aromatizantes de acordo com uma concretização do presente invento juntamente com esquemas de temporização para operação da aparelhagem;

as Figuras 2a e 2b são ilustrações gráficas do efeito global de partição/concentração na cromatografia líquida de alta precisão de quatro voláteis de enxofre e l-metionina;

a Figura 3 é uma representação gráfica da evolução no tempo para uma temperatura seleccionada de -20°C dos compostos da Figura 2;

a Figura 4a é uma representação gráfica do tempo de retenção e relações de partição da fase orgânica para uma variedade de voláteis orgânicos aromatizantes e outros compostos da Tabela 1;

a Figura 4b mostra a relação entre a temperatura e a par-

-5-

tição volumétrica do acetonitrilo, com e sem níveis adicionados de clorofórmio;

as Figuras 5a e 5b são curvas de resposta a HPLC para cafeína e outros compostos polares de uma bebida comercial de cola antes e depois da separação de fases num sistema de água/acetonitrilo;

as Figuras 6a, 6b e 6c são cromatogramas de HPLC para compostos orgânicos voláteis aromatizantes naturais e derivados da banana madura, utilizando um processo de partição de fases de acetonitrilo/água de acordo com o presente invento;

as Figuras 7a, 7b e 7c são cromatogramas de HPLC de compostos orgânicos voláteis aromatizantes derivados de queijo "sharp cheddar", queijo americano e queijo "blue", respectivamente, utilizando um processo de partição de fases de acetonitrilo/água de acordo com o presente invento; e

a Figura 8 é um cromatograma de componentes aromatizantes radiomarcados metanotiol e dimetilsulfureto produzidos por uma bactéria e analisados através da utilização de um processo de partição de fases de acetonitrilo/água de acordo com o presente invento.

Descrição do invento

De uma maneira geral, de acordo com o presente invento, proporcionam-se processos de partição e análise de compostos voláteis aromatizantes numa composição alimentar. Por compostos orgânicos aromatizantes, tais como um composto orgânico volátil aromatizante, entende-se um composto orgânico polar, que é um constituinte de um produto alimentar ou de uma composição de biocultura ou produto, possuindo menos de 15 átomos de carbono e compreendendo pelo menos um elemento seleccionado de entre o grupo que consiste em oxigénio, enxofre e azoto. Tal como usado aqui, o termo composto orgânico aromatizante inclui compostos aromatizantes derivados tais como derivados 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona de compostos voláteis de cetona aromatizantes. A derivação pode ser utilizada para modificar ou melhorar as características da separação e/ou detecção.

A composição alimentar pode ser qualquer produto alimentar comestível, mistura de produtos alimentares ou material biológico para o qual é necessária uma análise do componente aromatizante. Estas composições alimentares podem compreender alimentos ricos em hidratos de carbono tais como os cereais e grãos (por exemplo, arroz, aveia, cevada, milho e trigo), alimentos ricos em proteínas tais como carne, aves, peixe, ovos, legumes, nozes e lacticínios (p.e. leite, queijo natural, queijo processado, queijo caseiro e queijo creme), alimentos ricos em lípidos tais como a manteiga e óleos vegetais, vegetais e frutos, tempêros e aromatizantes comestíveis, assim como misturas, lotes e combinações preparadas de tais composições alimentares. Vários aspectos dos presentes processos são também dirigidos à separação de componentes ou análise de culturas biológicas ou produtos de fermentação, aqui referidos como "composições de biocultura" (que podem ser também produtos alimentares ou compostos de produtos alimentares). Exemplos de composições de biocultura são culturas de células bacterianas, animais, de levedura ou de outras plantas em que um ou mais compostos orgânicos polares é elaborado ou produzido pela cultura. Estão incluídos neste termo os produtos de hidrólise e derivados de produtos de hidrólise sequencial ou por passos de componentes e produtos celulares, os quais podem ser separados por processos de acordo com o presente invento para engenharia genética ou para fins de purificação.

De acordo com vários aspectos do presente invento, a composição alimentar ou produto de biocultura é dispersa numa mistura fluida de acetonitrilo e água de forma a proporcionar-se uma dispersão fluida da composição alimentar a uma temperatura de dispersão-extracção pré-seleccionada na gama de cerca de 10°C a cerca de 100°C. A composição alimentar pode ser dispersa numa mistura de acetonitrilo/água através de qualquer técnica de mistura adequada tal como dissolução, homogeneização, maceração e/ou mistura com corte (shear) baixo ou elevado ou moagem, com mistura com uma composição fluida de acetonitrilo-água. A mistura de acetonitrilo-água consiste essencialmente em acetonitrilo e água. De sejavelmente, a mistura de acetonitrilo estará substancialmente

-7-

livre de outros componentes solventes, mas em várias aplicações podem incluir-se pequenas quantidades de outros componentes solventes desde que não interfiram com a análise ou extracção. De uma maneira geral, combinam-se quantidades apropriadas de composições alimentares ou de biocultura, água e acetonitrilo de modo a obter-se uma dispersão fluida da composição alimentar e/ou composição de biocultura com cerca de 10 a cerca de 50% em peso de sólidos alimentares ou de biocultura não aquosos e cerca de 50 a cerca de 90% em peso de acetonitrilo baseado no peso total da dispersão fluida da composição alimentar e/ou de biocultura. Prevê-se que a composição alimentar ou de biocultura possa ser ela própria anidra (por exemplo, certos produtos alimentares secos ou de base lipídica) ou mais tipicamente, ela pode conter uma quantidade substancial de água. A quantidade de água na composição alimentar ou de biocultura, e a afinidade da composição alimentar ou de biocultura pela água, será um factor na determinação da quantidade de água respectiva (se alguma) e de acetonitrilo a combinar com a composição alimentar ou de biocultura para formar a dispersão com acetonitrilo e água.

Os componentes acetonitrilo e água da dispersão fluida da composição alimentar ou de biocultura formam uma solução homogénea à temperatura ambiente que funciona como solvente para os componentes voláteis aromatizantes da composição alimentar. Devido ao facto de composição alimentar estar intimamente distribuída na solução de acetonitrilo-água, consegue-se uma extracção rápida e altamente eficiente de tais compostos para a fase acetonitrilo-água na dispersão fluida da composição alimentar.

Após a formação da dispersão, a dispersão é arrefecida a pelo menos cerca de 5°C e de preferência a pelo menos cerca de 25°C até uma temperatura de menos de cerca de -10°C, a qual é suficiente para causar a separação de fases da solução de acetonitrilo-água para produzir uma fase rica em acetonitrilo contendo os compostos voláteis aromatizantes da composição alimentar e uma fase rica em água separada contendo os componentes da composição alimentar privados dos componentes voláteis aromatizantes.

A mistura com fases separadas deve ser mantida mais conve

nientemente a uma temperatura de separação de fase de menos de cerca de -10°C sob condições quiescentes durante um período de tempo de preferência de cerca de pelo menos 10 minutos, o qual é suficiente para separar as fases em duas camadas distintas, a fase rica em água e a fase rica em acetonitrilo respectivamente. Por "condições quiescentes" entendem-se condições de não turbulência adequadas à coalescência de fases. Tal coalescência de fases pode ser levada a cabo num vaso adequado à separação de fases, preferencialmente com uma razão altura/largura maior do que um, numa posição fixa com pouca ou sem agitação durante o tempo de separação das fases. Alternativamente pode usar-se um aparelho de extracção em contracorrente com uma temperatura e razões acetonitrilo/água semelhantes. Se desejado, a formação de camadas pode ser aumentada por centrifugação sob condições quiescentes.

Geralmente a fase rica em acetonitrilo compreenderá pelo menos cerca de 85 por cento em peso de acetonitrilo e menos do que cerca de 15 por cento em peso de água, baseados no peso total da fase rica em acetonitrilo. Similarmente, a fase rica em água compreenderá geralmente pelo menos cerca de 80 por cento em peso de água e menos de cerca de 20 por cento em peso de acetonitrilo, baseados no peso total da fase rica em água separada. A separação de fases e a formação de camadas pode ser levada a cabo de modo a proporcionar uma camada de acetonitrilo clarificada substancialmente isenta de componentes alimentares não dissolvidos, que é conveniente para utilização directa em procedimentos analíticos subsequentes tais como a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC).

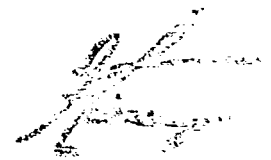
Os processos de acordo com o presente invento podem ser facilmente automatizados. A este respeito, ilustra-se na Figura 1a uma concretização de um extractor em linha de componentes orgânicos com acetonitrilo e um sistema de análise quantitativa 10.

O dispositivo 10 ilustrado funciona de modo a obter-se uma amostra líquida de um produto alimentar, como por exemplo a partir de uma corrente do processo, amostra que pode ser derivada se necessário. A amostra é extraída usando uma separação de fases binária aquosa/acetonitrilo, e é analisada directamente por HPLC,

CC, FIA, ou outro instrumento analítico adequado, sem a necessidade de filtração extensiva, extracção da fase sólida, ou outros métodos de purificação da amostra. O acetonitrilo extrai selectivamente materiais não polares de compostos polares iónicos e de alto peso molecular e pode ser directamente injectado num dispositivo analítico tal como um cromatógrafo líquido de alta precisão. A análise dos compostos que seria normalmente excluída na extracção orgânica (p. exp., compostos de carbonilo de baixo peso molecular) é facilitada pelo uso de um reagente de derivação tal como o 3-metil-2-benzotiazolinona, que forma um derivado menos polar do composto, o qual é depois extraído selectivamente para a fase orgânica de um sistema binário. A fase de acetonitrilo é formada sujeitando a mistura a uma temperatura baixa e não tem, como tal, compostos adicionais que possam interferir com a análise.

A operação do dispositivo 10 da Figura 1a começa quando a amostra líquida 12 da corrente do processo 14 é bombeada pela bomba 16 e dirigida para a linha de amostragem 18. Após o volume de amostra ter entrado na linha 18, a válvula 20 actua, obrigando o ar a circular e impelindo a amostra para o vaso de extracção 22. Se a amostra necessitar de derivação, a bomba 24 adiciona o volume necessário de reagente de derivação a partir do reservatório 26. A temperatura e a agitação são controladas no vaso 22 através de conjuntos apropriados de serpentinas de arrefecimento, de agitadores e/ou de aquecedores do vaso 22 para completar o passo de derivação.

O volume adequado de acetonitrilo frio (-20°C) é então adicionado a partir do reservatório 30 por intermédio da bomba 32 a uma razão pré-seleccionada (1:1 ou superior). A agitação continua e a temperatura é mantida a -20°C por intermédio do conjunto de serpentina de arrefecimento do vaso 22 durante um período de tempo pré-seleccionado até refrigerar completamente a amostra (1 a 10 minutos), a agitação é então parada e a fase de acetonitrilo separa-se do material aquoso, extraíndo os compostos aromáticos e não polares de baixo peso molecular (por exemplo, menos de 150 daltons) a serem analisados.



-10-

Uma amostra de 3 ml da fase orgânica é então retirada pela bomba 34. Depois da entrada da amostra na linha, as válvulas 36 e 38 actuam, obrigando o ar a impelir a amostra para a câmara de amostragem de HPLC no auto-amostrador 40. O auto-amostrador injecta então uma quantidade exacta (5-100 microlitros) no sistema analítico, como por exemplo num cromatografo líquido de alta precisão compreendendo uma fase líquida móvel no reservatório 42, uma bomba de HPLC 44, um auto-amostrador 40, uma coluna analítica 46 e um detector de UV 48 de acordo com a prática convencional.

Após a injeção, a válvula 38 actua e a bomba 34 opera, forçando a amostra a ser expelida para um receptáculo de resíduos. A bomba 34 pára e a válvula 36 actua, repondo-a. A bomba 50 opera esvaziando o vaso de extracção, depois pára completando o ciclo de operação.

Mostra-se o computador 52 juntamente com a interface do sistema de extracção 54 e a interface analítica 56. O sistema de computador pode ter qualquer configuração de recolha/controlo de dados capaz de comandar o sistema de extracção baseado em temporização programada de acontecimentos, bem como o sistema analítico. Alternativamente pode comandar-se o dispositivo analítico por um sistema de microprocessamento separado e opcionalmente enviar os dados através de processos de transmissão de dados e protocolos standard ao computador 52.

As tabelas 1b e 1c que acompanham a Figura 1a descrevem uma matriz de controlo usada para implementar o controlo por computador do sistema de extracção e a operação global do sistema completo. Os valores temporizados e sequências são aproximados e podem ser alterados de forma a acomodar os diferentes passos de extracção, dispositivos analíticos ou tempos de análise desejados.

Tendo sido descritos os vários aspectos do presente invento descrever-se-ão agora mais particularmente, concretizações específicas de tais processos e aparelhos que utilizam uma partição entre acetonitrilo e água a baixa temperatura, usando HPLC em fase inversa para determinar a partição global em fase orgânica de alguns voláteis de enxofre de baixo peso molecular e de outros voláteis orgânicos.

-11-

EXEMPLO 1

Nestes testes, adicionaram-se compostos orgânicos voláteis aromatizantes conhecidos a alíquotas de 2 ml de acetonitrilo:água 50:50, 22°C em frascos de HPLC de 4 ml, agitados cuidadosamente e rolhados com tampas de politetrafluoroetileno com septo. Fizeram-se variar os níveis dos compostos de 0,02 a 1,0% p/v ou v/v de modo a obter respostas equivalentes no detector de UV. As amostras foram injectadas (20 μ l) num aparelho de HPLC em contínuo. A técnica de separação utilizada foi a separação de fases de um sistema nominal de acetonitrilo:água 1:1, o qual formou fases separadas em 10 minutos a -20°C. Esta separação separou eficazmente os compostos orgânicos voláteis das gorduras, proteínas, aminoácidos e sais, tornando-a adequada para preparação das amostras para cromatografia. A cromatografia líquida de alta resolução em fase inversa (HPLC) foi usada para determinar o coeficiente de partição, par vários voláteis orgânicos, e o tempo mínimo necessário para a partição completa (1 hora). A partição orgânica foi relacionada com os tempos de retenção em HPLC como se mostra na Figura 4a. As amostras podiam ser mantidas durante 24 horas sem alteração significativa. O aparelho HPLC utilizado foi um injector de amostra Waters XISP com o modelo 710B, bomba 6000A e detector UV 481 ajustado a 210 nm (Waters Associates, Milford, MA). Usou-se uma unidade Radiomatic Flo-One Beta para integração dos picos (Radiomatic Instruments, Inc., Tampa FL). Usou-se uma coluna Alltech adsorbosphere C18, 5 micra, 250 mm x 4,6 mm (Alltech Associates, Deerfield, IL) para se obter a separação dos componentes de acordo com o processamento convencional em HPLC. A fase móvel tinha a seguinte composição: 45% de acetonitrilo, 55% de água, 0,2% KH_2PO_4 , pH 3,0. O caudal era de 1,0 ml/minuto. Os frascos foram então colocados num frigorífico (-20°C) durante 1 hora. Colocaram-se então 250 μ l das fases orgânica e aquosa resultantes num frasco de volume limitado, a amostra foi injectada e conseguiram-se as integrações dos picos. O coeficiente de partição, P, foi calculado por divisão dos valores de integração da fase orgânica pelos da fase aquosa.

Para determinar o período de tempo apropriado para a parti

-12-

ção completa, trataram-se quatro voláteis de enxofre e l-metionina como descrito acima, com a exceção de que as amostras foram tiradas a tempos diferentes até 60 minutos (Figuras 2a, 2b e 3).

A Tabela 1 lista os tempos de retenção e coeficientes de partição calculados para vários compostos orgânicos voláteis e não voláteis.

Tabela 1

Tempos de retenção e coeficientes de partição para compostos orgânicos em sistemas de fase de acetonitrilo

<u>Composto</u>	<u>Tempo de re tenção(min)</u>	<u>Coeficiente de partição</u>	
		<u>Binário^a</u>	<u>Ternário^b</u>
Valerato de etilo	13,8	25,9	25,6
Ácido caprílico	11,2	20,8	20,6
Sulfureto de dimetilo	9,9	16,7	17,7
Clorofórmio	9,9	---	16,2
Butirato de etilo	8,7	14,3	17,6
Sulfureto de dimetilo	5,4	5,2	6,6
Metanotiol	4,7	4,0	5,2
2-fenil-etanol	4,3	3,3	2,3
Sulfureto de hidrogénio	3,9	4,6	5,2
Ácido butírico	3,2	3,1	2,7
l-fenilalanina	2,8	0,1	0,3
l-metionina	2,5	0,03	0,2
Ácido acético	2,5	1,1	0,9
Ácido láctico	2,3	0,6	0,8
l-galactono-1,4-lactona	2,1	0,2	0,2
Ácido l-ascórbico	2,1	0,4	0,3

a - Acetonitrilo/água 1:1, 1 h a -20°C.

b - Acetonitrilo/água/clorofórmio 5:5:1, 22°C.

Os compostos anfipáticos (aminoácidos) sofreram partição para a fase aquosa enquanto os compostos voláteis, relativamente menos polares sofreram partição para a fase orgânica. Os ácidos orgânicos com uma estrutura global de cadeia linear até C₈ sofre-

-13-

ram partição para a fase rica em acetonitrilo. Os ácidos de peso molecular mais elevado em cadeia linear eram insolúveis a temperatura baixa e acumularam-se na interface. Os componentes aromáticos não polares com pesos moleculares de 250 Daltons ou inferiores foram extraídos selectivamente para a fase orgânica rica em acetonitrilo, presumivelmente devido à interacção das ligações pi-pi do anel aromático com o grupo nitrilo do acetonitrilo. Havia uma relação entre os tempos de retenção em HPLC e a partição orgânica como se mostra nas Figuras 2-4. Os compostos mais não polares, com tempos de retenção de 8 ou mais minutos, sofreram uma partição forte para a fase orgânica com coeficientes de partição maiores que 10.

As Figuras 4a e 4b e Tabela 1 mostram que o coeficiente de partição (P) de compostos orgânicos no sistema binário de fases (acetonitrilo e água apenas) é independente da temperatura e da razão volúmica orgânica/aquosa. Os pontos experimentais descrevendo as características das fases para o sistema ternário (acetonitrilo, água e clorofórmio são apresentados na tabela e figuras para efeitos de comparação). Os níveis de clorofórmio adicionados podem causar interferências na análise cromatográfica qualitativa e quantitativa.

O acetonitrilo/água é um solvente muito bom para a maior parte dos compostos orgânicos polares e não polares de baixo peso molecular. O método de partição descrito foi utilizado para extracção e concentração rápida dos voláteis de material aquosos mais complexos para análise por HPLC ou outros sistemas. Obtiveram-se fases orgânicas límpidas para injeção directa a partir de meios de crescimento microbiológico com células e de produtos alimentares.

EXEMPLO 2

Este exemplo ilustra a extracção de cafeína de uma bebida de cola usando partição aquosa a frio de uma solução de acetonitrilo de uma bebida de cola.

Usou-se uma bebida de cola comercial (Pepsi) para demonstrar a extracção selectiva do composto orgânico relativamente não

-14-

polar, cafeína, usando a extracção em fase binária. Colocou-se 1,5 ml da cola num frasco de 3 ml e 1,7 ml de acetonitrilo. A amostra foi agitada durante 20 segundos e foi arrefecida até -20°C durante uma hora. Colocaram-se então 0,3 ml da fase orgânica num frasco de amostragem de HPLC. O sistema HPLC usado foi: uma coluna de fase inversa fenflica (Alltech Associates, Deerfield, Illinois) $250 \times 4,6$ mm, 5 micra, fase móvel de 25% de acetonitrilo, 75% de água 0,2% p/v de KH_2PO_4 , pH 3,0, caudal de 1,5 ml/min, injeção de 20 μl pelo auto-amostrador. Detecção UV a 210 nm.

A Figura 5a é um cromatograma da mistura original da cola mais acetonitrilo antes da partição na fase fria. O cromatograma da Figura 5b corresponde à fase orgânica após partição na fase fria. A cafeína (tempo de retenção 3,7 minutos) é extraída selectivamente para a fase orgânica, enquanto os outros compostos polares e iónicos são excluídos.

EXEMPLO 3

Este exemplo ilustra a extracção de um derivado ceto-ácido de banana madura através do uso de partição fria de uma pasta aquosa da banana com acetonitrilo. Misturaram-se em cada um de dois vasos de 20 ml de volume, 5 g de banana madura com 5 ml de água destilada e 7 ml de acetonitrilo. A um adicionou-se 1 ml de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) (0,4% p/v), um agente de derivação para compostos ceto. Ambos os frascos foram colocados a 50°C durante 30 minutos para a reacção de derivação. Foram então arrefecidos a -20°C e assim mantidos durante uma hora. Colocaram-se 0,3 ml da fase orgânica num frasco de HPLC e injectaram-se 20 μl no sistema de HPLC descrito anteriormente. As Figuras 6a e 6b mostram quantitativamente a quantidade das amostras não derivada e derivada respectivamente, medidas a um comprimento de onda de absorção UV de 210 nm. Os picos mais pequenos representam compostos não polares extraídos directamente da polpa de banana. O pico grande presente na amostra derivada é suposto ser o derivado de um composto ceto. A Figura 6c corresponde a outro cromatograma da amostra derivada, detectado a 320 nm UV, um comprimento de onda ao qual a ligação MBTH-ceto absorve. O cromatograma mostra que o pico a 8,3 minutos é um derivado MBTH. O com-

posto foi presumivelmente identificado como ácido oxaloacético. O ácido oxaloacético teria sido normalmente excluído da fase orgânica, mas o passo de derivação selectiva produziu um composto não polar que é selectivamente extraído para a fase orgânica.

EXEMPLO 4

Este exemplo ilustra a extração de derivados de compostos aromatizantes ceto de queijo através do uso de partição fria de uma pasta aquosa do queijo com acetonitrilo.

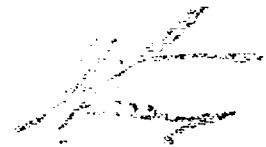
Usaram-se três vasos de 20 ml de volume. Misturaram-se 5 g de cada uma das seguintes variedades de queijo, "sharp cheddar", queijo americano e queijo "blue" com 5 ml de água destilada e 7 ml de acetonitrilo. Adicionou-se a cada um 1 ml de uma solução de MBTH (0,4%). As amostras foram cuidadosamente agitadas e foram mantidas a 50°C durante 30 minutos para se completar o passo de derivação. As amostras foram então arrefecidas a -20°C durante 1 hora. Colocaram-se 0,3 ml da fase orgânica num frasco de amostragem de HPLC e injectaram-se 20 μ l no sistema de HPLC descrito anteriormente. As Figuras 7a, 7b e 7c são os cromatogramas de absorção dos três tipos de queijo a 320 nm, comprimento de onda ao qual se detectam exclusivamente os derivados MBTH-ceto. As amostras de queijo americano e cheddar aparentaram ter qualidades semelhantes de ceto-ácidos, em quantidades diferentes. Dois dos compostos foram presumivelmente identificados como derivados do ácido glioxílico e pirúvico. O queijo "blue" mostra possuir pelo menos cinco compostos ceto adicionais. Isto é consistente com a noção corrente de que o aroma do queijo "blue" é devido em grande parte aos ceto-ácidos especialmente à 7-heptanona que está presente em maior teor na amostra de queijo "blue" e que se sabe ser o componente com maior contribuição para o aroma do queijo "blue". Os ácidos pirúvico e glioxílico teriam sido normalmente excluídos da fase orgânica, mas a derivação selectiva produziu derivados não polares que são facilmente extraídos pelo acetonitrilo.

EXEMPLO 5

Este exemplo ilustra o uso de separação de fases com redução de temperatura com células biológicas para finalidades analíticas e extração de biocomponentes, recuperação ou análise. Desse modo, as culturas biológicas de células de bactérias, de plantas ou animais podem ser processadas, com ou sem ruptura da parede celular, em camadas separadas clarificadas compreendendo uma camada rica em acetonitrilo contendo os componentes extraídos e uma camada rica em água contendo as bactérias, proteínas e outros materiais celulares.

Utilizam-se geralmente espécies de Brevibacterium em queijos limberger e outros queijos curados à superfície. Sabe-se que espécies como a B. linens possuem a enzima metionina-liase [E.C. C. 4.4.11] que cliva o aminoácido l-metionina do queijo em metanotiol, um composto aromatizante que contribui para um cheiro e sabor a cebola ou alho nos queijos. [Ferchichi, M., et al., J. General Microbiology, 131, pp 715-723 (1985)]. A quantificação do metanotiol produzido a partir de metionina por uma cultura de crescimento de um B. casei em meio de crescimento não otimizado foi efectuada usando um sistema HPLC com detectores de ultravioletas e de radioisótopos. Adicionou-se l-metionina não radioactiva 5 mM a 1 ml de meio de ATP juntamente com $2,0 \times 10^7$ cpm ^{35}S -metionina. Adicionou-se um inóculo de 1,0% de B. casei ATCC 35513 ao meio, e o frasco foi rolhado com uma tampa com septo. O frasco foi incubado durante 3 dias a 30°C. Produziram-se níveis vestigiais de metanotiol e dissulfureto de dimetilo (o produto da oxidação do metanotiol) pela cultura em crescimento lento.

Injectaram-se 1,2 ml de acetonitrilo puro através do septo e a amostra foi rapidamente agitada em vortex. A amostra foi então mantida a -20°C durante uma hora. A fase orgânica estava clara e livre de resíduos celulares. Removeram-se 250 μl da amostra e colocaram-se num frasco de HPLC de volume limitado. A quantificação dos compostos aromatizantes de enxofre foi levada a cabo utilizando o sistema HPLC e os coeficientes de partição descritos anteriormente para os mesmos compostos de enxofre. A Figura 8 mostra o cromatograma com detector de isótopos da fase orgânica.



O metanotiol e dissulfureto de dimetilo foram detectados a níveis de ppm.

Embora o presente invento tenha sido descrito com particularidade em relação a concretizações específicas, deve ter-se em consideração que se podem efectuar várias modificações e adaptações com base na presente descrição que estejam no espírito e alcance do presente invento.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo para partição e análise de compostos voláteis aromatizantes ou de outros compostos orgânicos numa composição alimentar ou de biocultura, caracterizado por compreender os passos seguintes:

- dispersão de uma composição alimentar ou de biocultura numa mistura fluida de acetonitrilo e água, de modo a obter-se uma dispersão da composição fluida,

- arrefecimento da dispersão até uma temperatura de separação de fases, que seja suficiente para causar a separação de fases da mistura fluida de acetonitrilo e água de modo a produzir uma mistura de fases separadas, com uma fase rica em acetonitrilo contendo os compostos orgânicos aromatizantes da composição, e uma fase rica em água contendo os componentes da composição sem os compostos orgânicos aromatizantes,

- manutenção da mistura de fases separadas a uma temperatura de separação das fases sob condições quiescentes de forma a separar as ditas fases em duas camadas distintas, uma camada clarificada rica em acetonitrilo contendo os compostos voláteis aromatizantes da composição e uma camada rica em água contendo os componentes da composição sem os compostos orgânicos aromatizantes, e

- análise em relação a aromas orgânicos de pelo menos uma porção da camada rica em acetonitrilo.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo de análise se efectuar por meio de cromatografia líquida de elevado rendimento.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo de análise se efectuar por cromatografia gasosa.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo de análise se efectuar por análise de injeção de fluxo, espectroscopia ou polarografia.

-19-

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos compostos orgânicos aromatizantes serem derivados antes do referido passo de arrefecimento.

6 - Aparelho para extracção com separação de fases e para análise dos compostos orgânicos aromatizantes, caracterizado por compreender:

- meios de mistura para mistura de uma composição alimentar ou de biocultura com acetonitrilo e água de modo a formar uma dispersão homogénea de uma composição alimentar numa mistura de acetonitrilo-água,

- meios para arrefecimento da referida dispersão homogénea na referida mistura acetonitrilo-água de forma a provocar uma separação por fases, e para separar a dispersão separada em fases numa camada rica em água, contendo a composição alimentar ou de biocultura sem os compostos orgânicos voláteis e uma camada rica em acetonitrilo clarificada, contendo os compostos orgânicos aromatizantes extraídos da referida composição alimentar ou de biocultura, e meios para analisar os compostos orgânicos voláteis aromatizantes, na dita camada rica em acetonitrilo.

Lisboa, 22 DEZ 1983

Por KRAFT, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

