

CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL NA RESOLUÇÃO DE ENANTIÔMEROS ENVOLVIDOS EM FLAVOURS DE FRUTAS**Alexandre Porte^{a,*}, Luciana H. Maia Porte^b e Luciana M. de Oliveira^a**^aDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Av. Pasteur, 296, 22290-240 Rio de Janeiro – RJ, Brasil^bDepartamento de Administração e Turismo, Instituto Multidisciplinar, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rua Governador Roberto da Silveira, s/nº, 26020-740 Nova Iguaçu – RJ, Brasil

Recebido em 27/02/2014; aceito em 04/08/2014; publicado na web em 22/09/2014

CHIRAL GAS CHROMATOGRAPHY IN THE RESOLUTION OF ENANTIOMERS INVOLVED IN FRUIT FLAVOURS. This work addresses the use of chiral gas chromatography in resolving optically active stereoisomers and racemates found in fruit flavours. It presents the types of chiral selectors applied to terpene-derived metal coordination compounds, polysiloxane-linked α -amino acid and mixed chiral stationary phases, and focuses on derivatized cyclodextrins, the most popular chiral stationary phases presently used in chromatographic analysis. Knowledge about the techniques involved in chiral recognition and enantiomer identification in the fruit flavour field is given along with examples from the latest studies.

Keywords: chromatography; enantiomers; flavour.

INTRODUÇÃO

Flavour é a sensação gerada a partir do cheiro, do gosto e de estímulos táteis no interior da boca provocados pelos alimentos, mas frequentemente o termo é usado como sinônimo de odor,¹ como aqui neste trabalho.

O conhecimento do *flavour* de um alimento é de grande interesse e importância para a indústria de alimentos, já que este exerce efeito decisivo na escolha do indivíduo em consumir um certo produto.

Já são conhecidos mais de 7.000 compostos e estima-se que até 10.000 substâncias voláteis estejam envolvidas na composição dos *flavours* dos alimentos. No morango, por exemplo, são mais de 300 substâncias voláteis e no café, mais de 1.000,¹ mas identificá-las e quantificá-las em matrizes complexas como os alimentos não é tarefa fácil, embora de importância vital para compreender o perfil de compostos aromáticos relevantes presentes e, assim, desenvolver alimentos mais atrativos para o consumidor.

As análises de identificação de substâncias voláteis tornam-se ainda mais difíceis de serem realizadas na presença de substâncias denominadas enantiômeros, que estão amplamente distribuídas nos alimentos.

Os enantiômeros ou compostos quirais são substâncias que apresentam a mesma fórmula molecular e imagem no espelho, mas não se sobrepõem devido à maneira como os átomos estão arranjados no espaço. Devido a esta grande semelhança estrutural, duas substâncias diferentes apresentam várias características físicas e químicas idênticas, como ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade.² Estas características inviabilizam a separação fácil e identificação destes compostos quirais através de métodos convencionais. Desta forma, cromatografia com fluido supercrítico, eletroforese capilar e técnicas miniaturizadas, como cromatografia líquida capilar e nano cromatografia líquida têm sido experimentadas, mas a cromatografia líquida de alta eficiência (para substâncias termolábeis ou não voláteis) e a cromatografia gasosa quiral acoplada a espectrometria de massas (para substâncias voláteis ou não voláteis derivatizadas) são as técnicas mais empregadas.^{3,4}

A separação de enantiômeros por cromatografia gasosa usando fases estacionárias quirais foi desenvolvida por Gil-Av *et al.*, na década de 60 em Israel.^{5,6} Na literatura, esta técnica pode ser encontrada com os nomes de cromatografia gasosa quiral, cromatografia gasosa enantiosseletiva ou enantiocromatografia gasosa.

Atualmente, empregando-se cromatografia gasosa quiral e espectrometria de massas é possível detectar facilmente quantidades traços de enantiômeros presentes em matrizes complexas.⁷ É o caso da determinação de α -damascona e α -ionona, em meio a mais de 200 substâncias voláteis do chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze).⁸

Em particular, a cromatografia gasosa bidimensional com fase estacionária quiral, que combina uma pré-coluna com fase estacionária quiral a uma coluna principal com fase estacionária quiral ou a coluna com fase estacionária quiral primeiro seguida da coluna com fase estacionária aquiral, tem demonstrado ser um método poderoso de estereonálise direta de substâncias voláteis sem qualquer processo prévio de derivatização, pois permite separar e “distribuir” melhor os picos no cromatograma.^{7,9}

Na área de alimentos, a cromatografia gasosa quiral tem sido aplicada na análise de leite, queijo, margarina, chá preto, carne, mel, bebidas alcoólicas, como vinho e cerveja, e compostos *flavorizantes* de frutas.¹⁰⁻¹⁶

A separação e identificação dos enantiômeros é de grande importância na área de *flavours* e óleos essenciais, não apenas para caracterizar uma matriz vegetal, mas também para avaliar uma via biossintética de um ou mais compostos e estabelecer sua origem.¹² Vários estudos da composição química de óleos essenciais têm empregado a cromatografia gasosa quiral ou a cromatografia gasosa multidimensional para separar enantiômeros outrora relatados sem distinção.^{6,17,18}

Os *flavours* são resultantes de misturas complexas de substâncias voláteis e geralmente consistem de centenas de substâncias de funções orgânicas diferentes, e entre elas os estereoisômeros opticamente ativos.¹⁵

Como os enantiômeros de um composto podem apresentar características de odor e *threshold* distintos, é fundamental a utilização de técnicas que permitam a elucidação da configuração absoluta (*R* ou *S*) presente, bem como o conhecimento da proporção e da

*e-mail: alexandre.porte@unirio.br

pureza enantiomérica destes compostos no alimento. A proporção enantiomérica é dada normalmente pelo excesso enantiomérico (ee) das substâncias quirais. A concentração do excesso enantiomérico é a diferença entre os percentuais dos dois enantiômeros, já a pureza enantiomérica é definida como a proporção (expressa em percentagem) dos enantiômeros detectados.^{7,19,20}

O termo *threshold* é utilizado para se referir à concentração mínima de um composto que pode ser detectada pelo olfato humano, geralmente presente em um volume de ar ou água definido. O (*S*)-(-)-limoneno e (*R*)-(+)-limoneno, por exemplo, encontrados nas cascas de frutas cítricas, possuem odores de laranja e limão, e *thresholds* de 8,4 µg m³ de ar e 5,9 µg m³ de ar, respectivamente.^{7,21,22} Isto significa que concentrações menores do cheiro de limão, se comparado ao cheiro de laranja, são necessárias para que um indivíduo perceba este odor.

A determinação do valor do excesso enantiomérico pode ser usada para determinar uma aromatização com um composto quirál sintético, pois em muitos casos, a biossíntese forma preferencialmente um enantiômero, enquanto a síntese química forma racematos, que não são separados por razões econômicas.^{10,19} E se naquele alimento o valor de excesso enantiomérico for disponível para aquele estereoisômero, este tipo de adição pode ser encontrada facilmente.^{12,19} O suco de framboesa pode ser citado como exemplo. Naturalmente, ele contém 92,4% de excesso enantiomérico de (*R*)-*trans*- α -ionona, sendo que uma amostra contendo valores discrepantes de excesso enantiomérico deste composto pode indicar uma adição de (\pm)-*trans*- α -ionona. Além disso, o valor do excesso enantiomérico de um determinado par de enantiômeros pode ser modificado durante um processamento, como ocorre na torrefação da aveia.¹⁹ Dependendo do pH, temperatura, estado físico (líquido ou sólido), processamento industrial (como fermentação) e outros fatores, muitas moléculas quirais podem racemizar ou sofrer inversão de configuração parcial, sendo possível então usar a pureza enantiomérica para avaliar a idade, o processamento recebido e até efeitos da estocagem em bebidas alcoólicas e não alcoólicas.¹⁰

A cromatografia gasosa quirál associada à espectrometria de massas também tem sido aplicada na identificação de enantiômeros de precursores e metabólitos químicos, drogas, pesticidas, organoclorados, feromônios, fragrâncias, terpenóides e até em fragmentos da lua Titan de Saturno.²³⁻²⁵

Diante do que foi exposto e da escassez de publicações nacionais sobre o tema, este trabalho apresenta uma revisão sobre cromatografia gasosa quirál com resultados relevantes sobre sua utilização na análise de enantiômeros envolvidos em *flavours* de frutas.

A CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL

A cromatografia gasosa quirál é uma cromatografia gasosa comum, com os mesmos sistemas de injeção e detecção, cuja diferença encontra-se na fase estacionária. Trata-se de uma substância quirál enantiomericamente pura (denominada seletor quirál) presente na fase estacionária que interage com a mistura de enantiômeros da amostra, produzindo formas diastereoisoméricas transientes, que serão separadas na fase estacionária, uma vez que diferentemente dos enantiômeros apresentam propriedades químicas e físicas diferentes. As interações entre estereoisômeros da amostra e os seletores quirais da fase estacionária não são permanentes e os compostos separados retornam a sua configuração enantiomérica original e são então detectados.²⁶

As fases estacionárias quirais são quimicamente ligadas a uma matriz de polisiloxano, que por sua vez é ligada à parede da coluna cromatográfica, a fim de aumentar a eficiência da separação, a estabilidade em temperaturas elevadas e a robustez.^{27,28}

Os mecanismos exatos de separação, contudo, ainda não foram elucidados, mas sabe-se que estão envolvidos inclusão, ligações de hidrogênio, forças de dispersão e interações dipolo-dipolo.^{5,15,21,29} Existem 3 tipos principais de fases estacionárias: compostos metálicos coordenados, derivados de aminoácidos e ciclodextrinas modificadas, que interagem com a amostra através de complexação, ligações de hidrogênio, e inclusão, respectivamente.^{21,22,30}

Fases estacionárias quirais baseadas em complexação metálica e em aminoácidos modificados

Um dos compostos metálicos quelados utilizados como seletor quirál era o dicarbonil ródio(I)-(IR)-canforato, mas outros derivados terpênicos de tujona, isomentona, carvona, pulegona associados a manganês, cobalto e níquel também eram encontrados. A temperatura de trabalho baixa (25-120 °C) do ródio limitava seu uso, e fases estacionárias quirais à base de níquel (*Chirasil*-Níquel[®]) apresentavam termoestabilidade maior. Era uma ferramenta útil, antes do surgimento das fases estacionárias quirais à base de dextrina modificada, para análise de compostos que não se ligam por ligações de hidrogênio, como feromônios, fragrâncias, produtos de reações enzimáticas e alguns *flavours*.³¹ Não foram encontrados trabalhos recentes empregando este tipo de seletor quirál.

A primeira fase estacionária quirál, produzida em 1966, era um derivado de isoleucina, e em 1977 surgiu a fase estacionária *Chirasil*-Val[®] (produzida a partir do aminoácido valina) que é bastante conhecida.^{26,30}

Muitas vezes os estereoisômeros estudados nestas colunas com fase estacionária *Chirasil*-Val[®] precisam ser derivatizados a fim de aumentar a volatilidade ou introduzir funções adequadas para formar ligações de hidrogênio entre analito e fase estacionária, e assim permitir uma análise mais refinada. Outra desvantagem do uso de colunas com fases estacionárias contendo seletores quirais à base de aminoácidos modificados ocorre na separação de aminoácidos de configuração relativa D e L, pois pode ocorrer a inversão de configuração do analito em temperaturas elevadas. Este fenômeno de inversão é denominado de inversão de esteroseletividade e pode ocorrer também em outras fases estacionárias, embora seja incomum.²¹

Não obstante, estas fases estacionárias quirais foram e ainda são utilizadas, por exemplo, na detecção da presença de D-aminoácidos em cervejas e vinhos.^{13,32} Como o consumo de cerveja ocorre em volumes maiores que o de vinho, tem sido sugerido um perigo potencial na ingestão de teores elevados de aminoácidos D, daí a preocupação em conhecer as concentrações destes compostos em diferentes tipos de cerveja.³³

Embora o mecanismo exato de separação dos seletores quirais das fases estacionárias quirais das colunas à base de aminoácidos modificados ainda necessite ser completamente elucidado, é sabido que a extremidade carboxila não exerce papel seletor importante, ao contrário da extremidade amida (em um dipeptídeo), por isso, a carboxila foi substituída por um segundo grupo amino e quando se emprega seletor L na fase estacionária quirál, geralmente os D-enantiômeros derivatizados da amostra são eluídos primeiro.³¹

Várias tentativas têm sido realizadas para associar em uma única fase estacionária aminoácidos modificados e ciclodextrinas, e assim combinar os efeitos de ligações de hidrogênio e inclusão na separação de enantiômeros, com o intuito de obter resultados melhores na separação e quantificação de enantiômeros do que o obtido em cada seletor quirál isoladamente.³⁴⁻⁴¹

Fases estacionárias quirais a partir de oligômeros de prolina (diprolina) também vêm sendo desenvolvidas, mas infelizmente continuam dependendo da derivatização prévia dos estereoisômeros da amostra se estes forem aminas, aminoácidos ou hidroxilácidos.³⁰

Fases estacionárias quirais baseadas em inclusão (ciclodextrinas)

Estas fases estacionárias são produzidas a partir de ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que consistem de no mínimo 6 unidades de glicose unidas por ligação α (1 \rightarrow 4).⁴²⁻⁴⁴

Embora ciclodextrinas com 12 ou mais resíduos de glicose sejam conhecidas, apenas os 4 primeiros homólogos, com 6, 7, 8 e 9 unidades de glicose, α , β , γ e δ , respectivamente, são bastante estudados e utilizados (Figura 1).^{43,45} Dentre elas, a β -ciclodextrina (7 monômeros de glicose) é a ciclodextrina mais usada devido ao custo baixo e patente expirada.^{46,47}

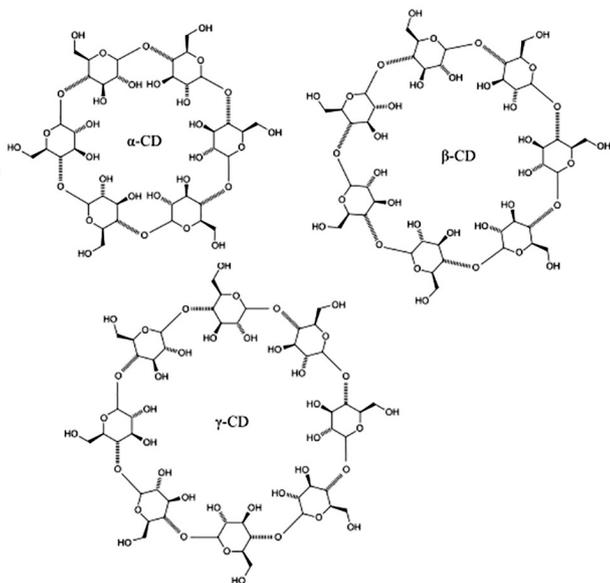


Figura 1. Estruturas químicas da α , β e γ ciclodextrinas

No estado sólido e em solução a conformação macrocíclica das ciclodextrinas corresponde a uma estrutura cônica invertida, mais precisamente toroidal, onde os grupos hidroxila secundários situados nos carbonos C-2 e C-3 estão localizados na base superior, enquanto os grupos hidroxila primários em C-6 estão na base inferior e a dimensão da cavidade é dada em função do número de monômeros de glicose da ciclodextrina.^{27,48}

A ausência de grupos hidroxila livres orientados para o interior da cavidade faz com que esta apresente um caráter hidrofóbico,

enquanto o exterior tem caráter hidrofílico e isto as credenciam como veiculadores eficientes de compostos hidrofóbicos, como compostos inorgânicos, fármacos, e moléculas aromáticas em meios aquosos.⁴⁹⁻⁵⁴

Em alimentos, as ciclodextrinas foram consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe* = Geralmente Reconhecida Como Segura) e têm sido usadas para: a) proteger compostos lipofílicos sensíveis ao oxigênio ou ao aquecimento; b) mascarar o gosto amargo de sucos de laranja e toranja (*grapefruit*) ao complexar naringenina e limonina; c) evitar o escurecimento de sucos de pera, maçã e banana ao complexar a enzima polifenoloxidase; d) remover colesterol de leite, manteiga, queijo, creme de leite, gema de ovo, banha de porco e maionese; e) permitir a liberação lenta de agentes antioxidantes e antimicrobianos; f) encapsular substâncias voláteis, como baunilha e óleos essenciais de limão, laranja e framboesa.⁵⁵⁻⁵⁷

O uso de α -ciclodextrina em alimentos é limitado devido à pequena cavidade interna que apresenta, mas seu uso como fibra tem se mostrado uma aplicação potencial. Além disso, elas são capazes de ligar 9 vezes seu próprio peso em lipídeos e poderiam ser usadas como suplementos para perda de peso.⁵⁸

As ciclodextrinas são produzidas a partir da ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase EC 2.4.1.19) sobre amido de várias fontes, como milho e mandioca.^{59,60} Como as ciclodextrinas são oriundas do amido, todas são dextrorrotatórias.²² Vários microrganismos, como *Thermoanaerobacterium*, *Klebsiella oxytoca* e algumas espécies de *Bacillus*, como *B. macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. stearothermophilus* e *B. lentus* produzem a enzima ciclodextrina glicosiltransferase.⁵⁹

No caso das fases estacionárias quirais, α , β e γ ciclodextrinas são comercialmente disponíveis. Estas ciclodextrinas apresentam propriedades diferentes, como o número de centros quirais, diâmetro e volume da cavidade, conforme apresentado na Tabela 1.^{27,42}

As primeiras colunas empacotadas com fases estacionárias quirais de α -ciclodextrina e formamida surgiram em 1983, mas tinham vida e eficiência limitadas.^{23,28} Isto provavelmente era devido à elevada polaridade e rigidez da ciclodextrina. A diluição em polisiloxano e a derivatização das hidroxilas resolveram este problema. Ainda hoje são desenvolvidos novos polímeros híbridos de ciclodextrina e siloxano.⁶¹

A polaridade dos polisiloxanos influencia na enantiosseletividade e é dependente da temperatura, contudo, na faixa de temperatura usada em cromatografia gasosa quiral, a enantiosseletividade parece ser favorecida por polisiloxanos apolares e/ou altas concentrações de ciclodextrinas modificadas.⁶²

Assim, a α -ciclodextrinas foram substituídas por per-*O*-metil- β -ciclodextrinas concentradas e depois por per-*O*-metil- β -ciclodextrinas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

Propriedade	α	β	γ
Número de unidades de glicopirranose	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Número de centros quirais	30	35	40
Diâmetro da cavidade (nm)	0,47-0,53 ~ 0,45	0,60-0,65 ~ 0,60	0,75-0,83 ~ 0,80
Volume da cavidade (nm ³)	0,176	0,346	0,51
Solubilidade em água (g/100mL, 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Valores de pKa	12,33	12,20	12,08
Ponto de Fusão (°C)	275	280	275
Forma dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramas monocíclicos	Prismas quadráticos
Tensão superficial (nM/m)	73	73	73
Velocidade de hidrólise ácida (n ⁻¹)	0,11	0,13	0,23

Fontes: Ref. 22, 27 e 105.

diluídas, que podem ser encontradas comercialmente e representam umas das ferramentas mais úteis na separação quirál.^{23,28} A fase estacionária quirál 2,3,6-tri-*O*-metil- β -ciclodextrina é uma das mais empregadas atualmente.⁶³

Outra forma de produzir colunas com fases estacionárias quiráis de ciclodextrina é partir de uma coluna capilar com fase estacionária convencional, como OV-1701, então a ciclodextrina derivatizada é quimicamente ligada e, assim, produzida a coluna com fase estacionária quirál.^{9,23,28,64}

Atualmente, a maioria das fases estacionárias quiráis derivadas de ciclodextrinas são preparadas por diluição da ciclodextrina derivatizada em polisiloxano.⁶² E uma mudança na diluição da ciclodextrina modificada em polisiloxano pode mudar o tempo de retenção de cada componente na mistura, devido a variação da polaridade na fase estacionária.⁶⁵

As ciclodextrinas modificadas apresentam enantiosseletividade excepcional junto a moléculas quiráis de muitas classes de compostos e são atualmente os seletores quiráis mais populares na separação de misturas enantioméricas de substâncias voláteis por cromatografia gasosa por sua estabilidade e reprodutibilidade.^{8,14,65} Além disso, mais de 90% das misturas não racêmicas de enantiômeros são separadas sem derivatização.^{5,12,65} Mais de 40 fases estacionárias quiráis estão disponíveis comercialmente e mais de 230 já foram descritas na literatura.¹⁵

Uma variação dessas fases estacionárias são as α , β ou γ per-*n*-pentil-ciclodextrinas. Todas são denominadas comercialmente de *Lipodex*[®] e podem ser aplicadas para a separação de uma série de enantiômeros.²³ As α , β e γ per-*O*-pentil-ciclodextrinas são líquidas a temperatura ambiente, estáveis termicamente e solúveis na maioria dos solventes orgânicos apolares. Isto representa uma vantagem em relação às per-*O*-metil-ciclodextrinas, que são sólidas e só podem ser usadas diluídas em polisiloxano, enquanto as per-*O*-pentil-ciclodextrinas podem revestir colunas capilares diretamente.⁶⁶ Outra vantagem desta fase estacionária quirál é ser altamente enantiosseletiva para compostos halogenados.⁸

A faixa de operação das fases estacionárias quiráis de ciclodextrinas peralquiladas normalmente é de -25 a 250 °C e isto pode ser muito útil pois, em alguns casos, temperaturas baixas são necessárias, como ocorrem em moléculas enantioméricas com poucos átomos como bromocloroformetano. Já existem fases estacionárias peralquiladas com estabilidade térmica até 300 °C, o que amplia consideravelmente a quantidade de compostos que pode ser analisada.⁶⁷

As fases estacionárias quiráis de ciclodextrina apresentam como vantagens: a) alto grau de inércia, permitindo a análise de substâncias polares sem derivatização; b) compatibilidade com todas as técnicas de injeção; c) grande estabilidade térmica, permitindo o uso de temperaturas mais baixas para a eluição de amostras polares.^{27,68}

A principal desvantagem encontrada para as ciclodextrinas é a perda do poder de resolução após 1 ano e meio aproximadamente. Isto afeta principalmente as substâncias mais voláteis, pois a temperatura de operação mínima começa a se elevar, possivelmente por rearranjos na estrutura, mas isto não foi observado quando a coluna foi 2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil- β -ciclodextrina/OV1701.⁶³

Colunas com fases estacionárias assimétricas, isto é, cujos substituintes nas posições 2 e 3 na molécula de glicose são diferentes, têm sido desenvolvidas, e embora a síntese seja mais complexa que as fases estacionárias quiráis simétricas (cujos 2 substituintes são iguais nas posições 2 e 3 da glicose), elas podem apresentar melhor resolução enantiomérica e de um número maior de enantiômeros, se comparadas às fases estacionárias quiráis simétricas equivalentes. Foi o que ocorreu quando foram testadas as fases estacionárias quiráis 2-*O*-metil-3-*O*-etil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina e 2-*O*-etil-3-*O*-metil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina contra

as fases estacionárias quiráis 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina e 2,3-di-*O*-etil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina, respectivamente.⁶⁹

Uma fase estacionária quirál à base de ciclodextrina derivatizada com uso universal para enantioseparação em cromatografia gasosa quirál ainda não existe, mas um grupo de três fases estacionárias pode separar mais de 85% dos racematos e misturas enantioméricas não racêmicas na área de aromas. As fases estacionárias quiráis de ciclodextrinas alquiladas (por exemplo 2,6-di-*O*-metil-3-pentil- β -ciclodextrina) e duas fases estacionárias quiráis de ciclodextrinas substituídas na posição 6 por grupos *terc*-butil-dimetil-silil e nas posições 2 e 3 por grupos metil, etil ou acetil podem satisfazer as necessidades analíticas de um laboratório nesta área de aromas.¹²

Na contramão desta idéia, o conceito “*one column for one problem*” também vem sendo difundido. Ele estabelece a elaboração de fases estacionárias quiráis únicas para separação de enantiômeros específicos.⁶⁹

Desde a década de 90, existem trabalhos com o objetivo de diminuir o tamanho das colunas com fases estacionárias quiráis de ciclodextrinas de 25 m (comprimento) \times 250 μ m (diâmetro interno) para 1 m \times 50 μ m. Estas novas colunas não estão disponíveis comercialmente ainda porque o reduzido diâmetro interno é uma dificuldade para o preenchimento da coluna de forma industrial. As colunas miniaturizadas não perdem eficiência nem enantiosseletividade, se comparadas às colunas tradicionais, porque embora o tamanho seja reduzido, a temperatura de eluição também é diminuída e oferecem redução (cerca de 85% a menos) do tempo de análise, que ocorre por volta de 90 minutos nas colunas com seletores quiráis convencionais. Todavia, são menos adequadas para uso em misturas complexas e são indicadas para separação de amostras contendo apenas pares de enantiômeros.^{64,70} Isto, portanto, restringe de certo modo seu uso na análise de aroma de frutas, que via de regra são componentes de matrizes complexas.

Para Mallmann *et al.*,⁷¹ as principais fases estacionárias quiráis conhecidas (3-*O*-butiril-2,6-di-*O*-pentil- γ -ciclodextrina ou *Lipodex E*[®]; 3-*O*-pentil-2,6-di-*O*-metil- β -ciclodextrina e 3-*O*-metil-2,6-di-*O*-pentil- γ -ciclodextrina) foram obtidas nas décadas de 80 e 90, e por isso eles desenvolveram uma fase estacionária nova (3-*O*-pentafluoropropionil-2,6-di-*O*-pentil- β -ciclodextrina), que apresentou boa performance na separação de enantiômeros normalmente encontrados em óleos essenciais.

Ciclodextrinas derivatizadas são os seletores quiráis mais usados e populares em colunas com fase estacionária quirál em uso na cromatografia gasosa.⁷² Trabalhos envolvendo detecção olfatométrica de compostos, isto é, detecção envolvendo um painel de experts em análise sensorial, não empregaram os outros tipos de seletores quiráis.^{73,74}

SEPARAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL

O reconhecimento molecular e a separação isomérica são fortemente governados pela substituição nos carbonos C-2, C-3 e C-6 (Figura 2). Estas posições no anel de glicose podem ser substituídas por diversos grupos funcionais, os quais provocam mudanças na ciclodextrina e influenciam no resultado das separações. Contudo, ainda é difícil dizer que fase estacionária quirál possui maior poder de separação dado um par de enantiômeros.⁷⁵

As ciclodextrinas derivatizadas diferem em suas propriedades físicas, químicas e cromatográficas dependendo do tamanho do anel da ciclodextrina e do tipo dos substituintes. Geralmente o C-6 aquiral é substituído por grupos apolares, como grupos alquil ou silil, para reduzir a polaridade ou liquefazer a ciclodextrina. Os substituintes nos C-2 e C-3, como grupos alquil ou acil, são introduzidos para alterar a seletividade quirál do material resultante.⁷⁶

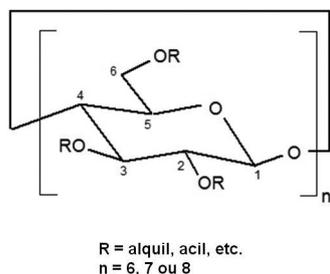


Figura 2. Glicopiranosose representada na ciclodextrina derivativada

A reatividade dos grupos hidroxila dos carbonos C-2, C-3 e C-6 são diferentes.⁷⁷ Os carbonos C-2 e C-6 são prontamente alquilados, mas o C-3 não, e exige procedimentos mais energéticos. Enquanto os grupos hidroxila em C-2 e C-6 são facilmente alquilados com NaOH como base catalítica, o grupo hidroxila em C-3 é estericamente menos acessível e necessita de mais tempo e NaOH em tetrahydrofurano seco para ser alquilado.^{22,66}

Quando o centro quiral está próximo à entrada da cavidade ou tem o substituinte orientado em posição específica, tal que possa formar uma interação com os grupos presentes na entrada da cavidade, a possibilidade de reconhecimento quiral é favorecida.²⁷

Di-*O*-pentil-ciclodextrinas ou per-*O*-pentil-ciclodextrinas são geralmente fases estacionárias satisfatórias, devido à flexibilidade conformacional dos grupos pentila, que diminuem o ponto de fusão das ciclodextrinas, ampliam a faixa operacional de trabalho e aumentam o tamanho da cavidade da molécula de ciclodextrina, resultando em um tamanho adequado para receber e acomodar as moléculas incluídas ou permitir uma distância adequada para a interação. O grupo cinamila também pode ser ligado a um dos carbonos para limitar a liberdade conformacional das moléculas de ciclodextrina e aumentar a cavidade de β -ciclodextrina.⁶⁶ As per-*O*-pentil- β -ciclodextrinas são mais enantiosseletivas do que a 3-*O*-acetil-2,6-di-*O*-pentil- β -ciclodextrina.⁸

Semelhantes às per-*O*-pentil-ciclodextrinas, as 6-*O*-metil-2,3-di-*O*-pentil-ciclodextrinas são versáteis e possuem uma enantiosseletividade única, principalmente a 6-*O*-metil-2,3-di-*O*-pentil- γ -ciclodextrina. Surpreendentemente, a 6-*O*-metil-2,3-di-*O*-pentil- γ -ciclodextrina perdeu quase toda a enantiosseletividade. Isto pode ter sido causado por interações dipolo-dipolo de resíduos de acila adjacentes, que provocaram a perda de flexibilidade da ciclodextrina, necessária para um arranjo de reconhecimento quiral somado ao efeito de proteção da entrada da cavidade, reduzindo sua dimensão.²⁹

É interessante notar que 3-*O*-acetil-2,6-di-*O*-pentil-ciclodextrinas são encontradas comercialmente e apresentam boa resolução, enquanto a inserção no C-6 do grupo acetil provocou a perda de enantiosseletividade.

Alguns grupos volumosos, como *tert*-butil-dimetil-silil (TDBMS) que influenciam na conformação da ciclodextrina aumentando a enantiosseletividade, foram adicionados em certas fases estacionárias quirais, mas existem diversos grupos que são usados como derivados nas posições 2, 3 e 6 das ciclodextrinas.^{5,23} Possivelmente, este aumento de enantiosseletividade está relacionado com a ancoragem de uma conformação nos resíduos de glicose β -glicosidicamente ligados.

Quando o grupo metil de C-6 (2,3,6-tri-*O*-metil- β -ciclodextrina/OV-1701) foi substituído por um grupo *tert*-butil, a seletividade para um grande número de analitos foi aumentada e através de modelagem molecular foi percebido que as formas das ciclodextrinas eram diferentes. Na verdade, não apenas as formas eram diferentes, mas as faixas de temperatura de operação das colunas foram modificadas. Enquanto na coluna com fase estacionária per-*O*-metil a faixa de temperatura de operação era de 160-250 °C, na coluna com fase estacionária *tert*-butil em C-6 a faixa de temperatura de operação

foi de 20-250 °C, permitindo assim a resolução de enantiômeros de massa molecular baixa.⁷⁶

Em contraste, outros autores acreditam na ancoragem da ciclodextrina ao polímero regioseletivamente a partir da posição 6, de forma a não bloquear a entrada do tórculo na posição 2 ou 3. O bloqueio da entrada de ciclodextrina pelo tamanho dos substituintes é prejudicial à separação enantiomérica e pode ser evitado empregando-se ciclodextrinas com 7 resíduos de glicose e metilando-se todas as hidroxilas residuais que não estejam sendo ocupadas por nenhum substituinte.⁶⁸

Quando as ciclodextrinas são derivativadas, os grupos hidroxilas são protegidos e substituídos por grupos éteres e portanto não se observa mais as interações do tipo ligações de hidrogênio, havendo com isso uma torção das estruturas destes derivados.²⁷

No entanto, quando são as fases estacionárias per-*O*-metil-ciclodextrinas essas torções são minimizadas podendo ainda ser capazes de formar complexos de inclusão. Com isso, a estereosseletividade das per-*O*-metil-ciclodextrinas é maior do que a das não derivativadas, não levando a uma perda de eficiência do processo cromatográfico. De fato, as per-metil- β -ciclodextrinas representam uma fase estacionária útil na resolução de misturas enantioméricas de substâncias voláteis pertencentes a diferentes classes de compostos.²⁸

A enantiosseletividade também difere entre α e β ciclodextrinas, indicando claramente que a dimensão da cavidade macrocíclica exerce um importante papel na inclusão de substratos quirais.⁸

Todas estas modificações nas ciclodextrinas derivativadas e os efeitos observados levam a crer que o modo de formação de complexos de inclusão parece ser provável no reconhecimento quiral. A substância a ser analisada entra na cavidade da ciclodextrina e se liga a pelo menos um centro quiral. A parte restante da molécula pode interagir com a ciclodextrina em outro ponto ajustando a molécula.²⁹

A interação via formação de um complexo na inclusão entre a ciclodextrina e o analito pode ser uma explicação da resolução quiral e alguns resultados experimentais são favoráveis a essa idéia. Primeiramente, enantiosseletividade comparável não pode ser observada quando oligômeros lineares de per-*O*-pentil-glicose são usados como fase estacionária quiral em cromatografia gasosa e, segundo, há claras indicações que a resolução óptica na ciclodextrina depende do tamanho da cavidade e da molécula a ser identificada.²⁹

Entretanto, uma vez que a separação de enantiômeros também pode ser realizada em per-*n*-pentil-amilose (bem menos eficientemente), a inclusão dentro da cavidade não pode ser pré-requisito para o reconhecimento quiral em ciclodextrinas modificadas. Nenhuma associação molecular forte é necessária, pois hidrocarbonetos saturados também são reconhecidos.^{21,27} Além do mais, muitas substâncias são tão grandes que não cabem na cavidade e mesmo assim seus isômeros são resolvidos e, como as ciclodextrinas contêm de 30 a 40 centros quirais em cada molécula, a interação enantiosseletiva pode ocorrer em outra parte da molécula.²⁹ Isso evidencia que o processo de reconhecimento quiral pode envolver mecanismo de inclusão, assim como interação do tipo ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo.²⁷ De fato, "aciclodextrinas", como tem sido chamadas as versões lineares das ciclodextrinas derivativadas, mostraram enantiosseletividade maior que as próprias ciclodextrinas derivativadas, quando foram comparadas (2,3-di-*O*-acetil-6-*O*-*tert*-butil-dimetil-silil)- β -ciclodextrina (CD 7, pois tem 7 unidades de glicose na ciclodextrina) com [(2,3-*O*,4'-*O*)-acetil-(1'-*O*,6-*O*)-*tert*-butil-dimetil-silil]maltoeptose (G7, pois tem 7 unidade de glicose na dextrina linear) e os respectivos congêneres com 8 carbonos.^{78,79}

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SEPARADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL

A identificação de compostos quirais pode ser realizada com ou

sem a necessidade de evidências quirópticas via co-injeção de um composto de estereoquímica conhecida.^{15,31} Contudo, o composto de interesse é sintetizado ou adquirido comercialmente e co-injetado em grande parte dos trabalhos.

O método de rotulagem enantiomérica consiste em adicionar uma solução padrão de concentração conhecida do composto e pela diferença determina-se a amostra.^{8,31}

Em alguns casos, os enantiômeros também podem ser previamente convertidos em estereoisômeros por agentes derivatizantes e então serem separados sem a necessidade de fases estacionárias quirais, mas é bastante sujeito a falhas devido à possibilidade de ocorrência de racemização ou uma derivatização incompleta.¹⁵ Este último método foi utilizado na análise quirál de substâncias voláteis do cajá (*Spondias lutea* L.).⁸⁰

Com apoio do banco de dados específicos para cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas ("espectrotecas"), como o *Chirbase*[®], é possível distinguir e identificar dezenas de milhares de enantiômeros.^{5,26} Eles fornecem as estruturas moleculares dos analitos, dados da separação, como tempo de retenção, dados bibliográficos, nomes de compostos, odores característicos de alguns enantiômeros, e seleciona condições ótimas de operação cromatográfica, tais como fase estacionária, temperatura, pressão, fase móvel, dimensão da coluna e, se necessário, permite o planejamento de reações de derivatização adequada.¹⁵ Uma outra biblioteca (sem nome comercial por enquanto) foi desenvolvida e correlaciona os espectros de massas com os índices de retenção lineares dos compostos presentes em *flavours*.⁹

Existe, ainda, um fenômeno que pode ocorrer e ser utilizado na identificação de substâncias. Trata-se da mudança de conformação ou configuração durante a análise, a qual resulta em um platô no registro, ao invés de um pico. Este processo é denominado enantiomerização e não racemização por ser um processo dinâmico que ocorre durante a cromatografia e não a transformação de uma mistura de enantiômeros em um racemato. Este fenômeno serve para reconhecer a labilidade de um estereocentro ou a integridade estereoquímica e é recomendado pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos na análise da integridade estereoquímica de drogas quirais.^{10,31} O programa *ChromWin*[®] permite determinar as taxas constantes de enantiomerização. A enantiomerização pode ocorrer dentro de uma primeira coluna com a interrupção do fluxo de gás, seguido de uma segunda coluna para separar os isômeros e uma terceira para analisar os compostos, ou simplesmente 2 colunas, uma para gerar a enantiomerização e outra para analisar os produtos, no caso de amostras menos complexas.⁸¹

CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL NA PESQUISA DE FLAVOURS DE FRUTAS

Os enantiômeros predominantes encontrados em frutas e as colunas empregadas nas análises de diversas frutas são apresentados na Tabela 2.

Agathosma betuina Berth e *Agathosma crenulata* (L.) Hook são pequenos arbustos nativos da África do Sul, também referidos na literatura internacional como "buchu", e suas folhas são usadas como flavorizantes em vinhos e alimentos. Seus frutos são um tipo de groselha preta da qual se obtém o *flavour* tipo cassis, usado em alguns sorvetes. Trabalhando com a fase estacionária quirál (2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina, os autores estudaram a composição do óleo essencial extraído das folhas e concluíram que todos os 4 estereoisômeros da 8-mercapto-*p*-mentan-3-ona eram de configuração absoluta (*S*).⁸²

Usando fases estacionárias quirais 2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil- β -ciclodextrina/OV-1701 e 2,3-di-*O*-acetil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina/OV-1701 em polpa de mamão *papayuela*

(*Carica pubescens*) foram identificados o 1,3-octanodiol e glicosídeos de 3-hidroxi-butanatoos, especificamente o 3-*O*- β -D-glicopiranosilbutanoato de etila e o 3-*O*- β -D-glicopiranosilbutanoato de butila, sendo que foram encontrados um valor de excesso enantiomérico de 90% de (*R*)-1,3-octanodiol, 96% de (*S*)-3-hidroxi-butanato de etila e 24% de (*S*)-3-hidroxi-butanato de butila, após a ação enzimática de β -glicosidase.⁸³ Esta fruta, *Carica pubescens*, não é o mamão papaia que normalmente é consumido no Brasil, mas sim uma espécie comum nas montanhas colombianas.⁸⁴ O mamão papaia que conhecemos trata-se do *Carica papaya* L.

Em maçãs (*Malus sylvestris*), utilizando a fase estacionária 2,3-di-*O*-acetil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina/OV-1701, foi encontrado o (*R*)-1,3-octanodiol com excesso enantiomérico superior a 99%. Este glicol, que possui atividade antifúngica, já havia sido identificado desde 1973 como uma das substâncias responsáveis pelo aroma de maçãs de diferentes cultivares, contudo a elucidação do enantiômero presente permaneceu obscura por mais de 20 anos. Também foram analisados o 5-(*Z*)-1,3-octenodiol e os ésteres destes dois álcoois, o 3-hidroxiocetanoato de etila e o 5-(*Z*)-3-hidroxiocetanoato de etila, e em todos foram encontrados excessos enantioméricos superiores a 99% da configuração (*R*).⁸⁵

A análise quiroespecífica do tamarilho (*Cyphomandra bateacea* Sendtn.), uma fruta nativa do clima temperado dos Andes e pertencente à família Solanaceae, revelou misturas racêmicas do 3-hidroxi-butanato de metila e do butanol-2, 50:50% e 48:52% de (*S*):(*R*), respectivamente. O butanol-2 é um componente comum em morango, banana, manga e mamão.⁸⁶ E em relação ao seu odor, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as configurações (*R*) e (*S*).²⁰ Já o 3-hidroxi-butanato de etila, o 3-hidroxi-xanoato de metila e o 3-hidroxi-xanoato de etila apresentaram uma distribuição enantiomérica de 68:32%, 73:27% e 63:37% de (*S*):(*R*), respectivamente. Os monoterpenos α -terpineol e 4-terpineol também foram encontrados com excesso enantiomérico da configuração (*S*), 76% e 48%, respectivamente, utilizando a fase estacionária quirál 2,3-diacetil-6-*O*-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina/OV-1701.⁸⁶ Este trabalho também serve para ilustrar que nem sempre as vias biossintéticas vegetais produzem grandes excessos enantioméricos de um determinado enantiômero.

O ácido 2-metilbutanóico, produzido por uma bactéria do gênero *Pseudomonas* sp., presente no solo, também foi analisado por cromatografia gasosa quirál. Os achados mostraram que ácido (*R*)-2-metilbutanóico com excesso enantiomérico de 100% foi produzido. Este enantiômero, que não é produzido comercialmente, tem odor de queijo e adocicado, enquanto o enantiômero ácido (*S*)-2-metilbutanóico é produzido comercialmente e apresenta odor doce, frutal e tropical. A partir do ácido (*R*)-2-metilbutanóico foi possível sintetizar iminas, cetonas e ésteres com aroma frutal.⁸⁷

Suárez *et al.*,⁸⁸ estudaram a casca de uma fruta colombiana, a *Solanum vestissimum* D., e encontraram acentuadas diferenças entre o odor da casca e da polpa, bem como as suas substâncias voláteis. Usando como fases estacionárias quirais 2,6-dimetil-3-pentil- β -ciclodextrina para a análise de 3-hidroxiésteres e 2,6-dimetil-3-butiril- γ -ciclodextrina para análise de lactonas, eles encontraram misturas racêmicas de linalol, 3-acetoxibutanato de metila e de 3-hidroxi-butanato de metila, 51:49%, 52:48% e 52:48% de (*R*):(*S*), respectivamente. Já o 3-hidroxi-metanoato de metila, 3-hidroxi-butanato de etila e a γ -hexalactona apresentaram relação 86:14%, 72:28% e 90:10% de (*R*):(*S*) e excesso enantiomérico de 70%, 44% e 80%, respectivamente.

De forma independente e empregando fases estacionárias quirais diferentes, dois trabalhos relataram a presença predominante de (*R*)- δ -lactonas em coco, mas cujos conteúdos diminuíam com o aumento de número de carbonos, assim houve excesso enantiomérico decrescente de (*R*)- δ -hexalactona, (*R*)- δ -octalactona,

Tabela 2. Substâncias quirais detectadas em frutos e tipos de colunas quirais aplicadas na separação dos enantiômeros

Fruta/Produto	Enantiômero majoritário	Coluna quiral
Suco de laranja (<i>Citrus sp.</i>) ¹²	(<i>R</i>)- α -pineno (<i>R</i>)-limoneno (<i>S</i>)-2-metilbutanoato de etila	TriMe- β -CD 2,6-DiMe-3-Pe- β -CD 2,6-DiMe-3-Pe- β -CD
Andes berry* (<i>Rubus glaucus</i> - Benth), fruta nativa dos Andes ¹²	(<i>S</i>)-heptanol	2,3-DiAc-6-TBS- β -CD
Toranja, Pomelo ou grapefruit (<i>Citrus decumana</i>) ⁷	(<i>R</i>)-1- <i>p</i> -menteno-8-tiol**	2,6-DiMe-3-TBS- β -CD
Pera (<i>Pyrus comunis</i> L.) ¹²	(2 <i>S</i> -4 <i>R</i>) e (2 <i>R</i> -4 <i>R</i>)-2-metil-4-pentil-1,3-dioxano 2 <i>S</i> -4 <i>R</i>) e (2 <i>R</i> -4 <i>R</i>)-2-metil-4-(2'(<i>Z</i>))-pentenil-1,3-dioxano	
Figo (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) ¹²	ácido γ -lactona (4 <i>R</i> , 5 <i>R</i>)-dihidroxiexanóico (solerol)	2,6-DiMe-3-Pe- γ -CD
Mamão das montanhas colombianas "papayuela" (<i>Carica pubescens</i>) ⁸³	(<i>R</i>)-1,3-octanodiol, (<i>S</i>)-3-hidroxi-butanoato de etila, (<i>S</i>)-3-hidroxi-butanoato de butila	2,6-DiMe-3-Pe- β -CD/OV-1701 e 2,3-DiAc-6-TBDMS- β -CD/OV-1701
Maçãs (<i>Malus sylvestris</i>) ⁸⁵	(<i>R</i>)-1,3-octanodiol, 5-(<i>Z</i>)-1,3-octenodiol, 3-hidroxi octanoato de etila, 5-(<i>Z</i>)-3-hidroxi octenoato de etila	2,3-DiAc-6-TBDMS- β -CD/OV-1701
Tamarilho (<i>Cyphomandra bateacea</i> Sendtn.), fruta nativa dos Andes ⁸⁶	Racemato de 3-hidroxi butanoato de metila e do butanol-2 (<i>S</i>)-3-hidroxi butanoato de etila, (<i>S</i>)-3-hidroxi exanoato de metila, (<i>S</i>)-3-hidroxi exanoato de etila, (<i>S</i>)- α -terpineol, (<i>S</i>)-4-terpineol	2,3-DiAc-6-TBDMS- β -CD/OV-1701
<i>Solanum vestissimum</i> D., fruta de origem colombiana, da qual os autores estudaram a casca. ⁸⁸	Racemato de linalol, 3-acetoxibutanoato de metila e do 3-hidroxi butanoato de metila (<i>R</i>)-3-hidroxi metanoato de metila (<i>R</i>)-3-hidroxi butanoato de etila (<i>R</i>)- γ -hexalactona	2,6-DiMe-3-Pe- β -CD para ésteres acíclicos 2,6-DiMe-3-butiril- γ -CD para lactonas
<i>Juniperus communis</i> L. (zimbros)	(-)- α -pineno, (-)- β -pineno, (+)-sabineno, (+)-canfeno, (+)-limoneno, (-)- β -felandreno, (+)-neomentol	β -CD/DB1701
<i>Juniperus oxycedrus</i> ambos argelinos ⁹²	(+)- α -pineno, (-)- β -pineno, (+)-sabineno, (-)-canfeno, (+)-limoneno, (+)- β -felandreno, (+)-neomentol	
Pêssego branco (<i>Prunus persica</i>) ¹	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-(-) 3-metil-(<i>E</i>)-5-decen-4-olídeo	
Framboesas (<i>Rubus idaeus</i> L.) ^{93,95,96}	(<i>R</i>)-(+)-(<i>E</i>)- α -ionona, (<i>R</i>)-(+)-limoneno (<i>R</i>)- α -pineno, (<i>S</i>)-terpinen-4-ol, (<i>S</i>)- δ -octalactona, (<i>S</i>)- δ -decalactona e racemato de α -pineno	2,3,6-TriMe- β -CD 2,3-DiMe-6-TBDMS- β -CD/DB1701
Sucos e cascas de yuzu (<i>Citrus junos</i> Sieb ex Tanaka), sudachi (<i>Citrus sudachi</i> Hort ex Shirai) e kabosu (<i>Citrus sphaerocarpa</i> Hort ex Tanaka) ¹⁰³	(3 <i>R</i>)-(-)-linalol, (3 <i>R</i>)-(+)-citronelol, lactona vinho-(-)-((3 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)- 3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetraidro-3,6-dimetilbenzofuran-2(3 <i>H</i>)-ona) (3 <i>S</i>)-(+)-linalol, (3 <i>R</i>)-(+)-citronelol, lactona vinho-(-)-(-)- ((3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,7 <i>aR</i>)-3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetraidro-3,6-dimetilbenzofuran-2(3 <i>H</i>)-ona) Racemato de linalol, (3 <i>R</i>)-(+)-citronelol, lactona vinho-(-)-(-)- ((3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,7 <i>aR</i>)-3 <i>a</i> ,4,5,7 <i>a</i> -tetraidro-3,6-dimetilbenzofuran-2(3 <i>H</i>)-ona)	2,3-DiAc-6-TBDMS- β -CD/SPB 20
Coco (<i>Cocos nucifera</i>) ^{89,90}	(<i>R</i>)- δ -hexalactona, (<i>R</i>)- δ -octalactona, (<i>R</i>)- δ -decalactona, (<i>R</i>)- δ -dodecalactona, (<i>S</i>)- δ -tetradecalactona	2,3,6-TriMe- β -CD 2,3-DiAc-6-TBDMS- β -CD
Morango (<i>Fragaria</i> sp.) ^{101,102}	(+)-linalol, (-)-furanol (4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2 <i>H</i>)-furanona), (<i>S</i>)-2-metilbutanoato de metila, (<i>S</i>)-(+)-2-metilbutanoato de etila, (<i>R</i>)- α -ionona, (<i>R</i>)-4-decanolídeo e (<i>R</i>)-4-dodecanolídeo	2,3-DiMe-6-TBDMS- β -CD 2,3,6-TriMe- β -CD
Manga (<i>Mangifera indica</i>) ¹⁰⁴	(1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-(+)- α -pineno, 2-(<i>S</i>)-metilbutanoato de etila e 2-(<i>R</i>)-metilbutanoato de etila	2,3,6-TriMe- β -CD
Goiaba (<i>Psidium guava</i>) ⁶	(<i>S</i>)-2-pentanotiol	

*Fruta dos Andes, em forma de baga (como morango, framboesa, amora, etc.) usada na fabricação de geléias. **Enquanto o (*S*)-1-*p*-menteno-8-tiol foi fraco e não específico para influenciar o aroma do pomelo.⁷

(*R*)- δ -decalactona, (*R*)- δ -dodecalactona até um excesso enantiomérico de (*S*)- δ -tetradecalactona.^{89,90}

Recentemente, δ -octalactona, γ -nonalactona, γ -decalactona e γ -dodecalactona foram relatadas como importantes componentes do *flavour* de abacaxi durante o amadurecimento, mas infelizmente os pesquisadores não empregaram fase estacionária quiral na análise.⁹¹

Os enantiômeros monoterpênicos das bagas de *Juniperus oxycedrus* e *Juniperus communis* L. argelinos foram identificados e quantificados com o auxílio de microextração em fase sólida, cromatografia quiral usando β -ciclodextrina e padrões dos compostos.⁹²

Este trabalho serve para ilustrar como pode ser realizada, de forma simples e convencional, o estudo de substâncias voláteis em frutos através de microextração em fase sólida e cromatografia gasosa quiral. Os autores esmagaram manualmente 200 mg do fruto, transferiram

para um frasco de 20 mL, fecharam com septo de silicone e aguardaram 30 minutos. Então, em triplicata, expuseram uma fibra para microextração em fase sólida constituída de divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano ao *headspace* estático do frasco, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. As substâncias foram desorvidas com a introdução manual da fibra no injetor do cromatógrafo a gás acoplado a um detector seletivo de massas a 250 °C, por 2 minutos, sem divisão de fluxo (*splitless*). As substâncias enantioméricas foram separadas em uma coluna capilar Cyclodex B® (fase estacionária de β -ciclodextrina - 10,5%) ligada a fase estacionária DB-1701) e foram identificadas através do uso de padrões analíticos analisados sob as mesmas condições (usando hélio como gás carreador com fluxo de 1 mL/minuto, a coluna mantida à temperatura de 40 °C/5 min, que foi então aumentada até 180 °C a uma velocidade de 1,5 °C/min).⁹²

Em outro trabalho, a associação da cromatografia quiral com técnicas olfatométricas permitiu identificar o isômero prevalente do 3-metil-(*E*)-5-decen-4-olídeo, o enantiômero (3*S*,4*R*)-(-) e os outros compostos de impacto, como o (*Z*)-6-dodecen-4-olídeo, do *flavour* de pêssego.¹

O trabalho de Flores *et al.*⁹³ é interessante, pois usaram fases estacionárias quirais 2 vezes na mesma investigação. Primeiro empregaram uma coluna com fase estacionária quiral de per-metil- β -ciclodextrina, especialmente projetada para eles, para separar os 4 estereoisômeros do jasmonato de metila de um produto comercial através de cromatografia líquida de alta eficiência. Este produto comercial de jasmonato de metila, normalmente é aplicado em framboesas e morangos para melhorar o aroma das frutas. Depois aplicaram cada um dos 4 isômeros separados sobre framboesas e avaliaram através de cromatografia gasosa quiral os efeitos destes sobre substâncias voláteis importantes para o aroma da framboesa: limoneno, α -ionona e β -pineno. Embora não tenham chegado a nenhuma conclusão sobre a ação dos isômeros de jasmonato de metila sobre β -pineno se comparado ao produto comercial (que contém uma mistura de estereoisômeros do jasmonato de metila), as framboesas tratadas com (-)-epijasmonato de metila ou [(-)-3*S*,7*R*]-jasmonato de metila apresentaram maiores teores de (*R*)-(+)-(*E*)- α -ionona e (*R*)-(+)-limoneno. O (-)-epijasmonato de metila está presente na concentração de apenas 2,5% no produto comercial vendido como jasmonato de metila. A (*R*)-(+)-(*E*)- α -ionona apresenta aroma de framboesa, enquanto a (*S*)-(-)-(*E*)- α -ionona apresenta aroma de madeira (Figura 3).^{7,21,22} Isto significa que é possível melhorar sensorialmente as framboesas aplicando o estereoisômero específico de jasmonato de metila. A (*R*)-(+)-(*E*)- α -ionona já havia sido relatada anteriormente como componente do aroma de framboesa.⁹⁴ A Tabela 2 apresenta outras substâncias voláteis detectadas no perfil aromático de framboesas.^{95,96}

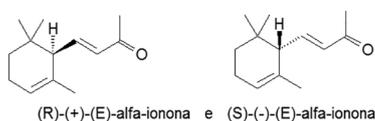


Figura 3. Estruturas químicas dos enantiômeros de (*E*)- α -ionona

A cromatografia gasosa quiral (fase estacionária quiral de dietil-*terc*-butil-silil- β -ciclodextrina) tem sido uma ferramenta empregada para detectar fraudes e adulterações por misturas com óleo essencial de laranja ou óleos destilados de diferentes origens no valioso óleo essencial de tangerina italiano, usado como agente flavorizante em sucos de tangerina e na indústria de cosméticos. O artigo destes autores, entretanto, mostra a vantagem de se empregar cromatografia gasosa bidimensional com fase estacionária quiral para evitar a coeluição de alguns monoterpenos presentes no óleo essencial de tangerina, ao invés de apresentar a detecção de fraudes em óleos essenciais de tangerina.⁹⁷

Em outro trabalho, os autores apresentam claramente que a cromatografia gasosa quiral pode ser uma das ferramentas para controle de qualidade da autenticidade dos óleos essenciais de tangerina ao permitir a separação, quantificação e identificação, com a ajuda de padrões analíticos, de 12 monoterpenos quirais característicos deste óleo, cuja adulteração por adição de óleo essencial de laranja pode ser facilmente encontrada. Mas os autores destacam que a adulteração por adição de compostos aquirais pode acontecer e sugerem outros métodos analíticos complementares, como cromatografia gasosa de alta resolução (para compostos aquirais), cromatografia líquida de alta eficiência (para frações não voláteis) e cromatografia gasosa com combustão e espectrometria de massas para razões isotópicas.⁹⁸

Além da investigação das razões isotópicas de deutério e de ¹²C/¹³C, os ácidos orgânicos presentes nas frutas também podem servir para avaliar a autenticidade de produtos derivados de frutas, uma vez que são menos susceptíveis a alterações durante o processamento e armazenamento dos produtos e também porque o conjunto de ácidos orgânicos presentes forma um perfil único para cada fruta.⁹⁹ Entretanto, na maioria das vezes, estes compostos precisam de derivatização prévia antes da análise por cromatografia gasosa.

Até a origem de sucos de laranja já foi possível ser investigada através da análise da distribuição enantiomérica de compostos quirais.¹⁰⁰

Também voltado para a detecção de fraudes, o estudo dos compostos quirais envolvidos no *flavour* de morango (*Fragaria* sp.) revelou a presença de (+)-linalol, (-)-furanol (4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona), (*S*)-2-metilbutanoato de metila, (*S*)-(+)-2-metilbutanoato de etila, (*R*)- α -ionona, (*R*)-4-decanolídeo e (*R*)-4-dodecanolídeo.^{101,102} E no estudo dos compostos quirais relacionados ao *flavour* de polpa e geléia de morango, além dos compostos (*S*)-2-metilbutanoato de metila, (*S*)-(+)-2-metilbutanoato de etila, (*R*)- α -ionona, (*R*)-4-decanolídeo e (*R*)-4-dodecanolídeo também foi encontrado (*R*)-4-octanolídeo. Entretanto, quando iogurte, sobremesa gelada e geléias adquiridas no comércio foram analisadas, estes compostos estavam ausentes ou presentes na forma de racematos, indicando a adulteração dos produtos.¹⁰²

Os sucos e as cascas de três frutas cítricas de origem japonesa: *yuzu* (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka), *sudachi* (*Citrus sudachi* Hort ex Shirai) e *kabosu* (*Citrus sphaerocarpa* Hort ex Tanaka) usadas como temperos em frutos do mar grelhados, em sobremesas e licores foram estudados por cromatografia gasosa bidimensional com fase estacionária aquiral de polietilenoglicol e fase estacionária quiral de 2,6-diacetil-6-*terc*-butil-dimetil-silil- β -ciclodextrina e apresentaram os mesmos enantiômeros de linalol e citrionelol em ambas as partes das frutas (suco e casca), mas enquanto o enantiômero (3*R*)-(-)-linalol foi majoritário no *yuzu*, o enantiômero (3*S*)-(+)-linalol foi majoritário no *sudachi* e no *kabosu* houve uma mistura racêmica dos compostos. Isto confere ao *yuzu* um odor madeirado, enquanto no *sudachi* o odor é frutal. Já o (3*R*)-(+)-citrionelol foi o enantiômero encontrado na casca e no suco das três frutas.¹⁰³

Varietades de manga do Estado do Rio de Janeiro - Brasil tiveram seus compostos de impacto, isto é, as substâncias mais significativas que caracterizam um dado aroma, investigados. Entre eles, o (1*R*,5*R*)-(+)- α -pineno conferiu nota de odor verde à variedade Tommy Atkins, e enquanto o enantiômero 2-(*S*)-metilbutanoato de etila conferiu nota de odor frutal, lembrando maçã, à variedade Carlota, o enantiômero correspondente ao 2-(*R*)-metilbutanoato de etila foi detectado na variedade Rubi e relacionado à nota de odor rançoso desta última variedade (Figura 4).¹⁰⁴

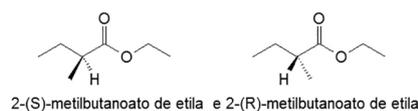


Figura 4. Estruturas químicas dos enantiômeros de 2-metilbutanoato de etila

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a seleção de uma fase estacionária para a resolução quiral de enantiômeros de substâncias *flavorizantes* em frutas ainda é um pouco empírica, já que existem indicações de determinadas fases estacionárias, mas não há uma fase estacionária quiral com uso universal e diferentes ciclodextrinas podem resolver mais eficientemente um ou outro composto. Mas há que se reconhecer que em menos de 20 anos houve um avanço considerável na elaboração de

colunas, por isso, acredita-se que tão logo se compreenda melhor os fenômenos de interação entre a amostra contendo a substância quiral e a fase estacionária quiral, a cromatografia enantiosseletiva terá suas aplicações ampliadas. Este processo já se iniciou e a identificação dos enantiômeros, bem como o valor do excesso enantiomérico, portanto, podem ser úteis como parâmetros de controle de qualidade na indústria de alimentos e de óleos essenciais, pois a proporção enantiomérica pode funcionar como uma impressão digital, capaz de indicar adulterações e alterações durante processos e armazenagem de diferentes produtos a base de frutas ou seus óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

- d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 123.
- Cremasco, M. A.; *Cienc. Cult.* **2013**, *65*, 4.
- Rocco, A.; Aturki, Z.; Fanali, S.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 206.
- Bonato, P. S.; Paías, F. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 318.
- Schurig, V.; *Ann. Pharm. Fr.* **2010**, *68*, 82.
- König, W. A.; Hochmuth, D. H.; *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 423.
- Mosandl, A.; *Food Rev. Int.* **1995**, *11*, 597.
- König, W. A.; Evers, P.; Krebber, R.; Schulz, S.; Fehr, C.; Ohloff, G.; *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7003.
- Liberto, E.; Cagliero, C.; Sgorbini, B.; Bicchi, C.; Sciarrone, D.; Zellner, B. D. A.; Mondello, L.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1195*, 117.
- Armstrong, D. W.; Chang, C. D.; Li, W. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1674.
- Bensch, W.; Mosandl, A.; Fischer, K.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 655.
- Bicchi, C.; D'Amato, A.; Rubiolo, V.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *843*, 99.
- Erbe, T.; Bruckner, H.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 81.
- König, W. A.; Lutz, S.; Hagen, M.; Krebber, R.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 35.
- Koppenhoefer, B.; Behnisch, R.; Epperlein, U.; Holzschuh, H.; Bernreuter, A.; Piras, P.; Roussel, C.; *Perfum. Flavor* **1994**, *19*, 1.
- Verzera, A.; Tripodi, G.; Condurso, C.; Dima, G.; Marra, A.; *Food Control* **2014**, *39*, 237.
- Simionatto, E.; Porto, C.; Stücker, C. Z.; Dalcol, I. I.; Silva, U. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1923.
- Sciarrone, D.; Ragonese, C.; Carnovale, C.; Piperno, A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6422.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; *Food Chemistry*, Springer: Berlin, 1999.
- Boellens, M. H.; Boellens, H.; Van Gemert, L.; *Perfum. Flavor* **1993**, *18*, 1.
- Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons: Chichester, 1994.
- Takeichi, T.; Toriyama, H.; Shimura, S.; Takayama, Y.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 179.
- Bourgeaux, E.; Combret, J. C.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4189.
- Yassaa, N.; Williams, J.; *Atmos. Environ.* **2005**, *39*, 4875.
- Sicoli, G.; Kreidler, D.; Czesla, H.; Hopf, H.; Schurig, V.; *Chirality* **2009**, *21*, 83.
- Schurig, V.; *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 3122.
- Silva, E. F.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 473.
- Schurig, V.; Schmalzing, D.; Mühleck, U.; Jung, M.; Schleimer, M.; Müssche, P.; Duvekot, C.; Buyten, J. C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 713.
- König, W. A.; Icheln, D.; Runge, T.; Pforr, I.; Krebs, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 702.
- Li, M.; Huang, J.; Li, T.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 199.
- Schurig, V.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 275.
- Ali, H. S. M.; Pätzold, R.; Brückner, H.; *Amino acids* **2010**, *38*, 951.
- Sarkadi, L. S.; Em; *Progress in Biological Chirality*, Palyi, G.; Zucchi C.; Caglioti, L., eds. Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Tokyo, 2004.
- Levkin, P. A.; Schurig, V.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 309.
- Levkin, P. A.; Lekvina, A.; Czesla, H.; Schurig, V.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4401.
- Levkin, P. A.; Lekvina, A.; Schurig, V.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5143.
- Levkin, P. A.; Ruderisch, A.; Schurig, V.; *Chirality* **2006**, *18*, 49.
- Levkin, P. A.; Lekvina, A.; Czesla, H.; Nazzi, S.; Schurig, V.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 98.
- Uccello-Barretta, G.; Nazzi, S.; Balzano, S.; Levkin, P. A.; Schurig, V.; Salvadori, P.; *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3219.
- Kreidler, D.; Czesla, H.; Schurig, V.; *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 208.
- Stephany, O.; Dron, F.; Tisse, S.; Martínez, A.; Nuzillard, J. M.; Peulon-Agasse, V.; Cardinaël, P.; Bouillon, J. P.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4051.
- Croft, A. P.; Bartsch, R. A.; *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1417.
- Pereira, C. S.; Moura, A. F.; Freitas, L. C. G.; Lins, R. D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 951.
- Ribeiro, A. O.; Serra, O. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 273.
- Toma, S. H.; Toma, H. E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 279.
- Xavier, C. R.; Silva, A. P. C.; Schwingel, L. C.; Borghetti, G. S.; Koester, L. S.; Mayorga, P.; Teixeira, H. F.; Bassani, V. L.; Lula, I. S.; Sinisterra, R. D.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 587.
- Fraceto, L. F.; Gonçalves, M. M.; Moraes, C. M.; Araújo, D. R.; Zanella, L.; Paula, E.; Pertinhez, T. A.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1203.
- Britto, M. A. F. O.; Nascimento Jr., C. S.; Santos, H. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 882.
- Zhu, J.; Wang, P.; Lu, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 171.
- Bustos, E.; Manriquez, J.; Juaristi, E.; Chapman, T. W.; Godínez, L. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1010.
- Ali, S. M.; Maheshwari, A.; Asmat, F.; Koketsu, M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 685.
- Souza, A. O.; Santos-Jr, R. R.; Sato, D. N.; Azevedo, M. M.; Ferreira, D. A.; Melo, P. S.; Haun, M.; Silva, C. L.; Durán, N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 682.
- Grillo, R.; Melo, N. F. S.; Fraceto, L. F.; Brito, C. L.; Trossini, G. H. G.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Moraes, C. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 290.
- Rezaei, B.; Ensafi, A. A.; Haghghatnia, F.; Aalaye, S. E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 2248.
- Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J.; *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1631.
- Ciobanu, A.; Landy, D.; Fourmentin, S.; *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 110.
- Del Valle, E. M. M.; *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033.
- Li, Z.; Chen, S.; Gu, Z.; Chen, J.; Wu, J.; *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *35*, 151.
- Moriwaki, C.; Mazzer, C.; Pazzetto, R.; Matioli, G.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2360.
- Moraes, C. M.; Abrami, P.; Gonçalves, M. M.; Andréo Filho, N.; Fernandes, S. A.; Paula, E.; Fraceto, L. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 777.
- Abbehausen, C.; Formiga, A. L. B.; Sabadini, E.; Yoshida, I. V. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1867.
- Dietrich, A.; Maas, B.; Mosandl, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 152.
- Bicchi, C.; Artuffo, G.; D'Amato, A.; Manzin, V.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 710.
- Bicchi, C.; Liberto, E.; Cagliero, C.; Cordero, C.; Sgorbini, B.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1212*, 114.
- Bicchi, C.; D'Amato, A.; Manzin, V.; Rubiolo, V.; *Flavour Fragrance J.* **1997**, *12*, 55.

66. Wenz, G.; Mischnick, P.; Krebber, R.; Richeters, M.; König, W. A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 724.
67. Liang, M.; Qi, M.; Zhang, C.; Fu, R.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1059*, 111.
68. Schimalzing, D.; Jung, M.; Mayer, S.; Rickert, J.; Schurig, V.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 723.
69. Bicchi, C.; Cagliero, C.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Martina, K.; Cravotto, G.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1106.
70. Cagliero, C.; Bicchi, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; *Food Chem.* **2012**, *132*, 1071.
71. Mallmann, A. S.; Ethur, E. M.; Silva, U. F.; Dalcol, I. I.; Morel, A. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2005.
72. Takahisa, E.; Engel, K.-H.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1063*, 181.
73. Biniecka, M.; Caroli, S.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1756.
74. Chaintreau, A.; Begnaud, F.; Starkenmann, C.; Em *Flavour Science: Recent Advances and Trends*; Bredie, W. L. P.; Petersen, M. A.; eds. Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2006.
75. Varga, G.; Tárkányi, G.; Németh, K.; Iványi, R.; Jicsinszky, L.; Tke, O.; Visy, J.; Szente, L.; Szemán, J.; Simonyi, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 84.
76. Shitangkoon, A.; Vigh, G.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *738*, 31.
77. Sandra, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 665.
78. Sicoli, G.; Jiang, Z.; Jicsinszky, L.; Schurig, V.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4092.
79. Sicoli, G.; Pertici, F.; Jiang, Z.; Schurig, V.; *Chirality* **2007**, *19*, 391.
80. Allegrone, G.; Barbeni, M.; *Flavour Fragrance J.* **1992**, *7*, 337.
81. Trapp, O.; Schurig, V.; *Comput. Chem.* **2001**, *25*, 187.
82. Mosandl, A.; Köpke, T.; Bensch, W.; *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 651.
83. Krajewski, D.; Duque, C.; Schreier, P.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1627.
84. Morales, A. L.; Duque, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 538.
85. Beverle, T.; Schreier, P.; Brunerie, P.; Bicchi, C.; Schwab, W.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 145.
86. Torrado, A.; Suárez, M.; Duque, C.; Krajewski, D.; Neugebauer, W.; Schreier, P.; *Flavour Fragrance J.* **1995**, *10*, 349.
87. Tachihara, T.; Hashimoto, H.; Ishizaki, S.; Komai, T.; Fujita, A.; Ishikawa, M.; Kitahara, T.; Em *Developments in Food Science*; Wender, L. P. B.; Petersen, M. A.; eds. Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2006.
88. Suárez, M.; Duque, C.; Bicchi, C.; Wintoch, H.; Full, G.; Schreier, P.; *Flavour Fragrance J.* **1993**, *8*, 215.
89. Nago, H.; Matsumoto, M.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1993**, *57*, 427.
90. Lehmann, D.; Maas, B.; Mosandl, A.; *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 55.
91. Steingass, C. B.; Grauwet, T.; Carle, R.; *Food Chem.* **2014**, *150*, 382.
92. Foudil-Cherif, Y.; Yassaa, N.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 1796.
93. Flores, G.; Blanch, G. P.; Ruiz del Castillo, M. L.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 2982.
94. Lehmann, D.; Dietrich, A.; Schmidt, S.; Dietrich, H.; Mosandl, A.; *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 207.
95. Malowicki, S.; Martin, R.; Qian, M. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6648.
96. Malowicki, S.; Martin, R.; Qian, M. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4128.
97. Sciarrone, D.; Schipilliti, L.; Ragonese, C.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1101.
98. Schipilliti, L.; Tranchida, P. Q.; Sciarrone, D.; Russo, M.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 617.
99. Kabir, Y.; Sidhu, J. S.; *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, John Wiley & Sons Ltda: Ames, Chichester, Oxford, 2012.
100. Luykx, D. M. A. M.; van Ruth, S. M.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 897.
101. Moreno, F. D. L. P.; Blanch, G. P.; Flores, G.; del Castillo, M. L. R.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1083.
102. Kreck, M.; Shcarrer, A.; Bilke, S.; Mosandl, A.; *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 389.
103. Tomiyama, K.; Aoki, H.; Oikawa, T.; Sakurai, K.; Kasahara, Y.; Kawakami, Y.; *Flavour Fragrance J.* **2012**, *27*, 341.
104. Lopes, D. C.; Fraga, S. R.; Rezende, C. M.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 31.
105. Saltão, R.; Veiga, F.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2001**, *37*, 1.