

ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS: CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO E ESPECTROMETRIA DE MASSA NA ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Desde há milénios
que as civilizações
têm recorrido às plantas e
às suas virtudes
terapêuticas para
prevenir e curar doenças.
As essências naturais,
em particular,
foram desde sempre
utilizadas pelas suas
propriedades anti-sépticas.
Mesmo antes
das descobertas de Pasteur,
já era conhecida a eficácia
de um grande número
de essências
na prevenção das infeções.
Os antigos "Tratados
de Matéria Médica"
estão repletos de receitas
em que se põe em evidência
o poder anti-séptico
das essências e
das resinas aromáticas,
algumas das quais
ainda hoje utilizadas.

José Barroso e Luís Pedro

Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Introdução - Desde há milénios que as civilizações tem recorrido às plantas e às suas virtudes terapêuticas para prevenir e curar doenças. As essências naturais, em particular, foram desde sempre utilizadas pelas suas propriedades anti-sépticas.

Um dos casos melhor conhecidos é o da técnica de embalsamamento utilizada no Antigo Egipto. Depois de eliminar o cérebro e as vísceras do cadáver, as cavidades eram preenchidas com uma mistura de "natrão" (carbonato de sódio hidratado natural) e resinas aromáticas e o corpo envolvido por ligaduras impregnadas com resinas e essências. Este tratamento permitia eliminar os microrganismos presentes nos tecidos, evitando a decomposição e assegurando a conservação do corpo.

Mesmo antes das descobertas de Pasteur, já era conhecida a eficácia de um grande número de essências na prevenção das infeções. Os antigos "Tratados de Matéria Médica" estão repletos de receitas em que se põe em evidência o poder anti-séptico das essências e das resinas aromáticas, algumas das quais ainda hoje utilizadas.

Os sabores e os aromas dos produtos naturais são o resultado da combinação de centenas de compostos, muitos dos quais em concentração vestigial. A concentração de cada um dos componentes na mistura confere-lhe características odoríficas particulares. Para além do seu emprego na área da saúde, os óleos essenciais são largamente utilizados na indústria alimentar e da cosmética, reconstituindo aromas e fragrâncias naturais.

A componente volátil dos óleos é constituída principalmente por terpenos (mono- e sesquiterpenos), álcoois, cetonas e aldeídos terpénicos. É frequente encontrarem-se compostos aromáticos, da via de síntese dos fenilpropanoides, bem como quantidades consideráveis de alcanos e álcoois alifáticos.

A identificação dos componentes dos óleos essenciais tem vindo a ser efectuada por espectroscopia de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (NMR). Embora o emprego destas técnicas permita identificar inequivocamente os compostos, o facto é que muitos deles aparecem em concentração vestigial, impossibilitando a obtenção de fracções com quantidade e pureza necessárias à correspondente análise.

A cromatografia gás-líquido tem encontrado nos últimos anos um número crescente de adeptos, estando a ser utilizada na separação de misturas complexas de produtos naturais, nomeadamente de óleos essenciais. Esta técnica, associada à espectrometria de massa tem-se revelado de grande utilidade na análise dos componentes dos óleos, com particular incidência para os de menor concentração.

Não cabe neste espaço tratar de forma exhaustiva os métodos de extração e análise dos óleos essenciais. A informação aqui deixada tem por objectivo permitir ao leitor menos familiarizado apreender alguns aspectos fundamentais do processo de extracção e da análise por cromatografia gás líquido associada à espectrometria de massa. No que concerne ao processo analítico, a informação é de índole mais geral, não estando o seu horizonte limitado aos óleos essenciais.

Extracção - O processo de extracção e isolamento do óleo essencial e bem assim os tratamentos subsequentes são determinantes da composição final do óleo. Durante esta fase podem surgir artefactos resultantes de isomerizações, saponificações ou polimerizações. Na generalidade dos casos, o óleo é obtido por destilação e/ou extracção com solventes orgânicos.

Hidrodestilação - De entre todos os processos de extracção, a hidrodestilação é de longe o utilizado há mais tempo.

Neste processo, os componentes do óleo essencial são extraídos e volatilizados pela água em ebulição, sendo ulteriormente recolhidos por condensação. Trata-se de um sistema introduzido por Clevenger em 1928 em que a água destila em circuito fechado, ficando o óleo retido à superfície da água junto ao condensador (Fig. 1). A grande vantagem do sistema reside na rápida quantificação do volume de óleo destilado.

Destilação/extracção por solvente - Em 1964 foi introduzido por S. Likens e G. Nickerson um sistema para o isolamento de óleos essenciais que é um processo misto de destilação e extracção por solvente. Neste sistema, o óleo é destilado e, ao nível do condensador, ainda na fase de vapor, é extraído da fracção aquosa por um solvente não miscível com a água, normalmente o pentano (Fig. 2). Após condensação, e devido à forma como está construído o aparelho, a água volta ao balão que contém o material vegetal e o pentano, com os componentes do óleo, regressa ao balão do solvente.

Extracção por solvente - São muito diversos os processos de extracção de óleos essenciais por solventes orgânicos: vão desde a utilização do extractor de Soxhlet (Fig. 3) até à simples maceração do material vegetal com solvente num balão. Tratando-se de solventes de baixo ponto de ebulição ($< 50^{\circ}\text{C}$), a vantagem do processo reside na não sujeição do óleo essencial a temperaturas elevadas, mesmo quando é necessário levar o solvente à ebulição como é o caso do extractor de Soxhlet.

Extracção pelo vácuo - A extracção de óleos essenciais por aquecimento do material vegetal a seco, a pressão reduzida, surge como alternativa aos métodos usuais. O material é aquecido a 90°C , em banho-maria, num balão que comunica com uma armadilha mergulhada em azoto líquido (-190°C). O sistema é ligado a uma bomba de vácuo e a pressão interna ajustada para 4×10^{-2} Torr (Fig. 4). Nestas condições, os compostos voláteis são extraídos do material vegetal e captuados na armadilha. No final do processo separa-se o óleo da água, também volatilizada do material vegetal, por

extracção líquido/líquido com pentano.

Problemas relacionados com a extracção - O óleo essencial acumula-se em estruturas secretoras especializadas. Quando se trata de estruturas secretoras internas, como é o caso dos canais e das bolsas, a velocidade de difusão dos componentes do óleo através do tecido é factor determinante do tempo requerido para a sua extracção. Este aspecto é menos relevante quando o óleo é produzido por tricomas, que são estruturas secretoras externas.

Os componentes de um óleo essencial podem dividir-se em dois grupos: hidrocarbonetos e compostos contendo oxigénio. Regra geral, os compostos que contêm oxigénio possuem pontos de ebulição superiores aos dos hidrocarbonetos. Verifica-se, porém, que, durante a extracção por destilação, os compostos oxigenados destilam em primeiro lugar. Esta aparente contradição é explicável pela sua maior solubilidade na água.

Durante a destilação, a água aquecida penetra no tecido e dissolve parte do óleo presente na estrutura secretora. A solução difunde-se através do tecido e, ao atingir a superfície, o óleo volatiliza. Ora, como os hidrocarbonetos têm menor solubilidade na água, acabam por ficar retidos no tecido por mais tempo. Se não se prolongar o processo de destilação por tempo suficiente, a composição final do óleo será falseada por uma maior concentração de compostos contendo oxigénio.

Muitos dos componentes dos óleos essenciais são susceptíveis de sofrer rearranjos químicos quando sujeitos a calor húmido. O mesmo pode ocorrer na presença de iões metálicos ou com a variação de pH. Neste contexto, a composição final de um óleo obtido por destilação pode ser afectada porquanto o pH da água de decocção do material varia entre 4 e 7, podendo, nalguns casos, apresentar valores inferiores, e é uma constante a presença de iões metálicos nos tecidos vegetais. Nos casos em que se utiliza o extractor de Clevenger, há ainda a considerar não só a cristalização de alguns compostos ao nível do condensador mas também o arrastamento dos compostos com oxigénio para o balão onde se encontra o

material vegetal, pela água em circulação.

O problema da cristalização e do arrastamento dos compostos não se põe com o extractor de Likens-Nickerson uma vez que os componentes dos óleos são extraídos pelo solvente ainda na fase de vapor.

A extracção por solventes orgânicos põe problemas de natureza diversa. Assim, após a extracção é necessário concentrar o óleo por evaporação do solvente, o que pode levar à perda dos compostos mais voláteis. Por outro lado, o solvente utilizado pode ser responsável por numerosos artefactos, como é o caso da acetona ou de álcoois, em que se verifica a formação de ésteres, éteres ou acetais. A maior desvantagem da extracção por solventes reside no facto de, juntamente com o óleo essencial serem extraídas substâncias lipófilas, nomeadamente ácidos gordos, ceras, flavonóides e cumarinas, que dificultam a análise subsequente. Este problema pode ser ultrapassado utilizando o sistema de Likens-Nickerson para separar a componente volátil. O recurso à cromatografia em coluna sobre sílica é outra forma de contornar esta dificuldade. No entanto, deve ter-se em conta a ocorrência de possíveis isomerizações.

Embora facilite a extracção, o sectionamento do material em pequenas porções pode ser responsável pelo aparecimento de compostos voláteis por degradação enzimática de compostos não voláteis.

Na extracção pelo vácuo os componentes do óleo não são submetidos a aquecimento prolongado e não estão sujeitos a variações de pH. Acresce que este processo é bastante rápido quando comparado com os métodos usuais: consegue-se uma extracção eficaz ao fim de uma hora.

As vantagens e desvantagens de cada um dos processos atrás descritos devem ser analisadas de *per si* tendo em vista o estudo a efectuar.

A generalidade dos óleos essenciais comercializados são obtidos por destilação. As alterações químicas que podem ocorrer durante a extracção têm a sua importância, sendo em muitos casos alterações desejadas, uma vez que podem conferir características aromáticas ao

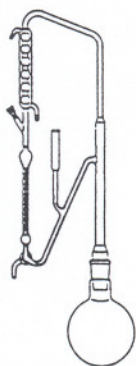


Fig. 1 - Extractor de Clevenger.

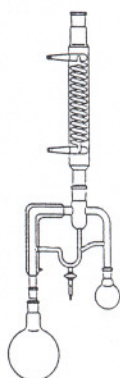


Fig. 2 - Extractor de Likens-Nickerson.



Fig. 3 - Extractor de Soxhlet.

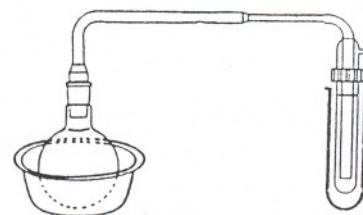


Fig. 4 - Extractor de vácuo (Barroso-Pedro)

óleo que não existirão no óleo inalterado.

Análise - A cromatografia gás-líquido é um método analítico em que a separação total ou parcial dos componentes da mistura é ditada por fenómenos de partilha entre duas fases não miscíveis (fase móvel e fase estacionária). A fase móvel é um gás quimicamente inerte, tanto para a fase estacionária como para os componentes da mistura, e a fase estacionária é um líquido de elevado ponto de ebulição. Pelas suas características, a técnica limita

a análise a compostos gasosos ou a compostos susceptíveis de serem vaporizados por aquecimento.

A amostra, uma vez no estado de vapor, é introduzida e transportada ao longo da coluna pela fase móvel ou gás de arrastamento. A separação de cada um dos componentes da mistura depende, basicamente, do coeficiente de partilha entre a fase móvel (gás) e a fase estacionária (líquido). Por outras palavras, a separação depende da afinidade que cada um dos componentes

manifesta para a fase estacionária.

Como gás de arrastamento pode utilizar-se hélio, azoto, hidrogénio e argón. À excepção do hidrogénio que é inflamável e explosivo, quando a sua concentração no ar atinge níveis críticos (10%), estes gases não apresentam perigo de utilização. O hidrogénio pode ser, no entanto, utilizado com relativa segurança porquanto, devido ao seu elevado coeficiente de difusão, não é fácil atingirem-se os níveis críticos em ambientes arejados. Na escolha do gás de arrastamento deve atender-se ao seu grau de pureza assim como às limitações impostas pelo detector instalado no cromatógrafo.

No cromatógrafo existem três zonas aquecidas cuja temperatura necessita de controlo adequado: Injector, Detector e Forno (Fig.5).

O injector é uma câmara de vaporização cuja temperatura deve ser ajustada para valores relativamente elevados (200-300°C), consentâneos com a estabilidade térmica da amostra, normalmente 50°C acima do ponto de ebulição dos componentes. Este procedimento prende-se com a necessidade da taxa de vaporização da amostra ter de ser elevada de molde a que a sua introdução na coluna não se prolongue no tempo. Uma vaporização prolongada tem efeitos adversos levando, nomeadamente, à formação de picos assimétricos (picos arrastados). Este fenómeno é também verificado quando o injector apresenta sujidade ou quando se injectam grandes quantidades de amostra. A quantidade de amostra injectada depende, entre outros factores, da quantidade disponível, da capacidade de carga da coluna e da sensibilidade do detector. Atendendo à baixa capacidade de carga das colunas capilares, os injectores dos cromatógrafos equipados com este tipo de colunas possuem um dispositivo de repartição de fluxo que faz com que apenas uma pequena quantidade de amostra injectada seja introduzida na coluna pelo gás de arrastamento e a restante lançada para a atmosfera. A relação de repartição de fluxo deve ser ajustada para cada caso, variando, normalmente entre 0 e 1:100.

O detector é um dispositivo do cromatógrafo que responde à saída dos componentes separados na coluna, produzindo um sinal eléctrico que, devidamente registado, dá origem ao cromatograma. A temperatura do detector deve ser ajustada para valores que impeçam a condensação dos componentes da amostra a esse nível.

Os cromatógrafos podem ser equipados com diferentes tipos de detector: ionização de chama, captura iónica, condutividade térmica, termo-iónico (selectivo para compostos contendo átomos de fósforo e azoto), entre outros. O detector de ionização de chama responde à generalidade dos compostos orgânicos sendo por isso o mais utilizado em cromatografia

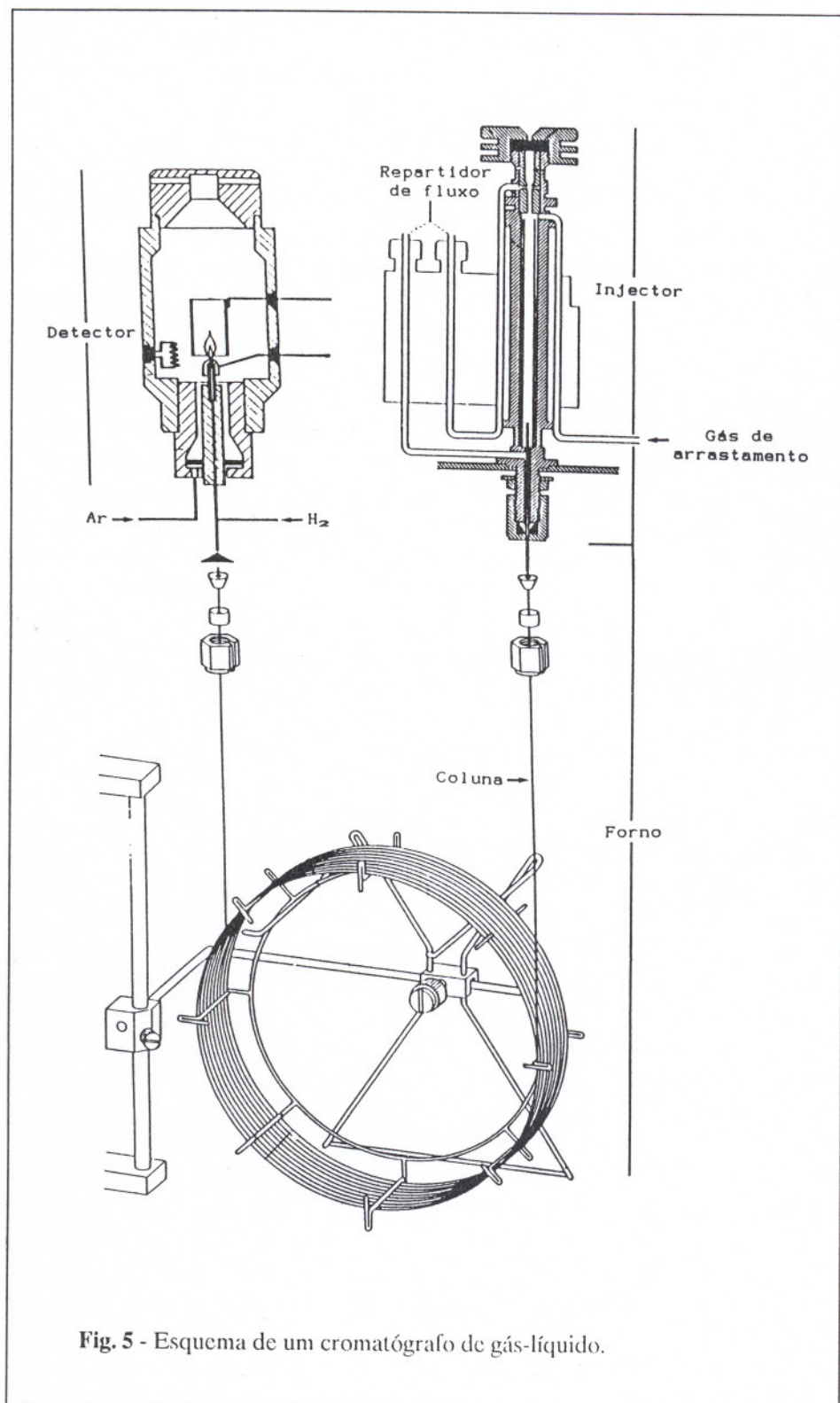


Fig. 5 - Esquema de um cromatógrafo de gás-líquido.

gás-líquido. O seu funcionamento baseia-se na capacidade da maior parte dos compostos orgânicos produzir iões quando queimados à chama. Quando o efluente da coluna penetra a chama do detector, cujo combustível é o hidrogénio, os compostos são ionizados e os iões recolhidos entre dois eléctrodos polarizados. Como a resistência eléctrica da chama é elevada ($\approx 10^{12} \Omega$), a corrente extremamente baixa ($\approx 10^{-10} A$) o sinal é amplificado por um sistema electrónico e transmitido a um registador.

O forno é a unidade do cromatógrafo onde se encontra instalada a coluna. A temperatura do forno deve ser devidamente controlada uma vez que é factor determinante da resolução e dos valores de retenção. Ou seja, do seu controlo depende a reprodutibilidade das condições de trabalho e consequentemente dos resultados.

Em termos gerais, quando se opera em condições isotérmicas, a baixa temperatura, os compostos permanecem muito mais tempo na fase líquida, eluindo por isso muito mais afastados uns dos outros (fig.6). Pelo contrário, quando a temperatura é elevada, os compostos têm tendência a permanecer na fase gasosa, devido à diminuição da sua solubilidade na fase estacionária, em consequência do aumento de temperatura. Nestas condições, os tempos de retenção são baixos e a resolução é pobre podendo mesmo haver sobreposição de picos (fig.7). Quando a diferença dos pontos de ebulição dos componentes da mistura é elevada (superior a $100^\circ C$), é preferível a temperatura programada. Neste caso, a temperatura aumenta com o tempo. A escolha de um programa de temperaturas adequadas permite separar os componentes de uma mistura num curto espaço de tempo sem perda de resolução (fig.8).

As colunas podem ser de dois tipos: colunas de enchimento e colunas capilares (colunas de alta resolução). As colunas de enchimento são relativamente curtas (1-5 metros) e possuem diâmetro interno da ordem de 2-10 milímetros. Por seu turno, as colunas capilares podem atingir 60 metros de comprimento e o seu diâmetro interno variar entre 0.1-0.5 milímetros. Atendendo ao maior poder de separação e selectividade destas colunas, a sua utilização está cada vez mais difundida. Estas características traduzem-se numa relativa facilidade em separar compostos que diferem, em muitos casos, apenas na localização da ligação dupla.

A versatilidade da cromatografia gás-líquido reside no número relativamente elevado de fases líquidas disponíveis que diferem, fundamentalmente, ao nível da polaridade.

Do ponto de vista prático, são atributos de uma boa fase líquida: não ser volátil (pressão de vapor < 0.1 Torr) à temperatura de operação, apresentar elevada estabilidade térmica, ser inerte em relação aos solutos e a polaridade ser

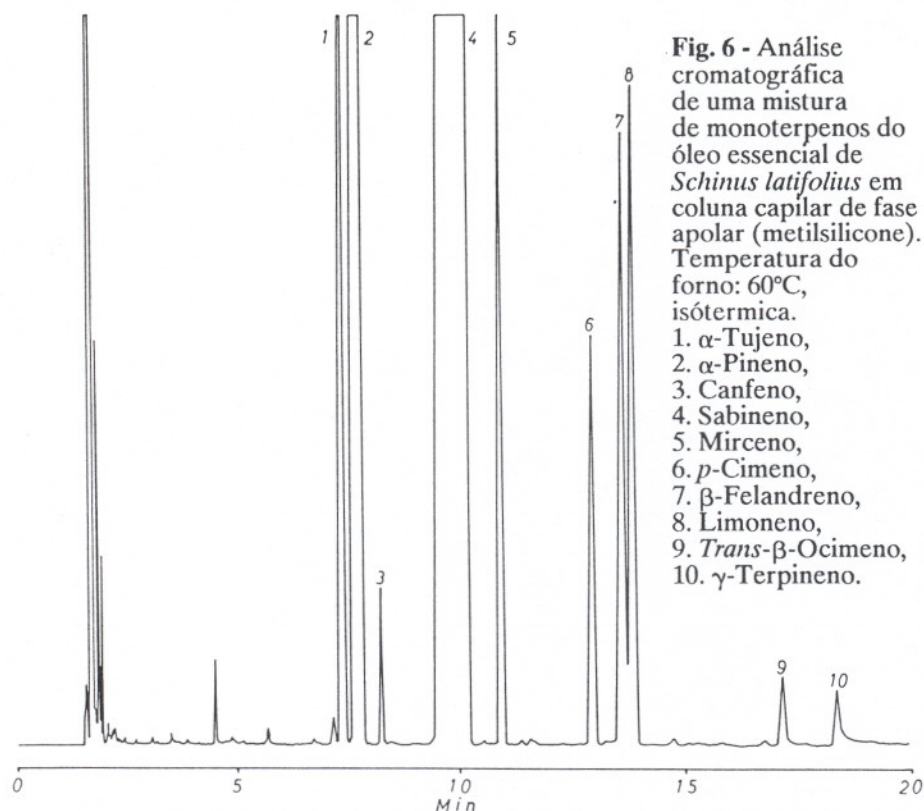


Fig. 6 - Análise cromatográfica de uma mistura de monoterpenos do óleo essencial de *Schinus latifolius* em coluna capilar de fase apolar (metilsilicone). Temperatura do forno: $60^\circ C$, isotérmica.
 1. α -Tujeno,
 2. α -Pino,
 3. Canfeno,
 4. Sabineno,
 5. Mirceno,
 6. *p*-Cimeno,
 7. β -Felandreno,
 8. Limoneno,
 9. *Trans*- β -Ocimeno,
 10. γ -Terpineno.

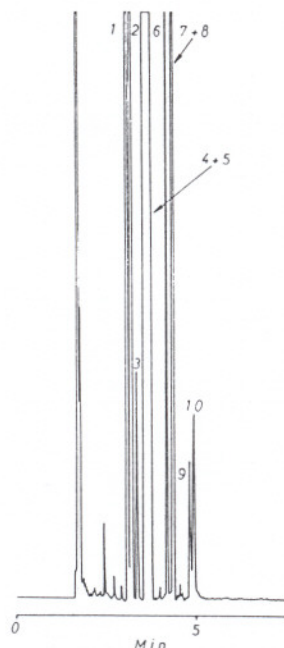


Fig. 7 - Análise cromatográfica da mistura de monoterpenos da fig. 6. Temperatura do forno: $100^\circ C$, isotérmica.

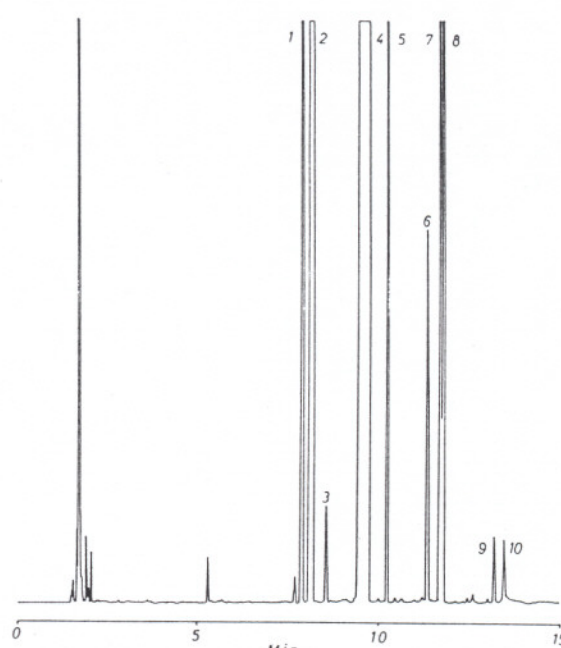


Fig. 8 - Análise cromatográfica da mistura de monoterpenos da fig. 6. Temperatura do forno: programação linear de $45-240^\circ C$, com incrementos de $3^\circ C$ por minuto.

tal que os valores do coeficiente de partilha (K) das substâncias a analisar sejam apropriados (nem muito altos nem muito baixos).

Apesar da cromatografia gás-líquido se ter revelado um método poderoso de separação de compostos com características químicas afins, no que se refere à análise qualitativa as suas potencialidades são bem mais reduzidas. Se é verdade que sob idênticas condições de trabalho o comportamento cromatográfico de uma dada substância é constante, não é menos verdade que valores de retenção idênticos não correspondem necessariamente a idêntica substância. Existe, com efeito, a possibilidade de substâncias diferentes apresentarem valores de retenção idênticos. A utilização de colunas de polaridade diferente a temperaturas diversas permite, no entanto, identificações relativamente seguras por cromatografia gás-líquido. A coincidência dos valores de retenção de uma substância desconhecida com os de uma amostra padrão constitui, neste caso, prova de identidade. Esta metodologia é morosa e requer a existência de um número infinito de amostras padrão.

Os tempos de retenção absolutos são de valor reduzido na análise qualitativa. Por muito pequenas que sejam as alterações das condições de trabalho, existe a possibilidade real de uma mesma substância apresentar tempos de retenção diversos. É preferível, por isso, utilizarem-se padrões, como, por exemplo, a série dos n-alcenos, e calcular o tempo de retenção dos componentes (índice de retenção) da amostra em relação aos tempos de retenção dos padrões.

A possibilidade de associar o cromatógrafo a um espectrómetro de massa tem permitido ultrapassar algumas das dificuldades encontradas na identificação de compostos por cromatografia gás-líquido.

Nos cromatógrafos equipados com colunas capilares, o efluente da coluna pode ser introduzido directamente na fonte iónica do espectrómetro. Os compostos separados na coluna, ao atingirem a fonte iónica, são bombardeados por um feixe de electrões de alta energia. As moléculas são ionizadas, tornam-se instáveis e fragmentam segundo padrões característicos. Os iões obtidos são discriminados segundo a sua massa (relação massa/carga; m/z) e recolhidos por um multiplicador electrónico. O sinal

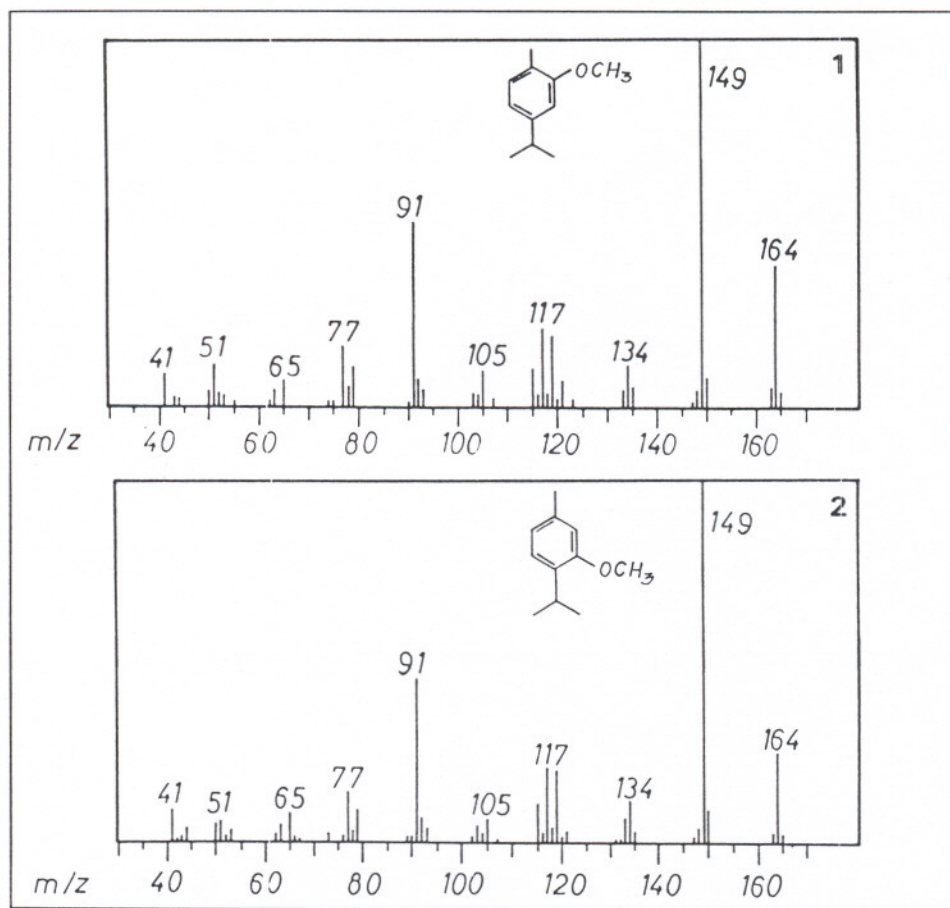


Fig. 9 - Espectros de massa de impacto electrónico de dois componentes do óleo essencial de *Crithmum maritimum*. 1. Metilcarvacrol, 2. Metiltimol. Apesar da grande semelhança do padrão de fragmentação, os compostos têm tempos de retenção distintos numa coluna de fase apolar (30 m \times 0,25 mm d. i.; temperatura do forno: programação linear 45-290°C a 5°C/min.): Metilcarvacrol, 695 s; Metiltimol, 675 s.

é ampliado e registado obtendo-se assim o espectro de massa.

A interpretação do espectro de massa tem por fim, face à fragmentação observada, racionalizar a estrutura do composto. A interpretação do espectro de massa de um composto orgânico complexo pode tornar-se num autêntico pesadelo atendendo às inúmeras combinações atómicas possíveis para cada ião.

Embora o espectro de massa seja, de facto, a "impressão digital" do composto a que se refere, a realidade é que alguns terpenóides possuem padrão de fragmentação idêntico. Este problema põe-se com particular acuidade quando a identificação é feita por correlação do espectro da amostra com os de uma biblioteca (fig.9). No caso particular dos óleos essenciais, a identificação deve ter

em conta não só o padrão de fragmentação do composto mas também os tempos de retenção sobre duas colunas de polaridade diferente. A análise de óleos essenciais por cromatografia gás-líquido de alta resolução associada à espectrometria de massa é um método particularmente seguro.

A cromatografia gás-líquido pode ainda fornecer dados quantitativos extremamente precisos, se devidamente considerados os factores que influem na análise. Em termos gerais, os picos registados no cromatograma são uma medida da resposta do detector a cada um dos componentes da mistura sendo a sua área proporcional à quantidade de substância detectada. A simples integração das áreas dá-nos, grosso-modo, a percentagem dos componentes da mistura.

Bibliografia:

Adams, R. P. (1989). Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Ed. Academic Press.

Gardais, J.-F., Gorin, Ph., Prevôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J. e Untz, G. (1982). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson.

Jennings, W. (1987). Analytical gas chromatography. Ed. Academic Press.

Koedam, A. (1987). Some aspects of essential oil preparation. In "Capillary gas chromatography in essential oil analysis". Ed. P. Sandra e C. Baccchi. Dr. Alfred Huethig Verlag, Heidelberg.

Neves, H. J. Chaves das (1980). Introdução à prática da cromatografia gás-líquido. Ed. Universidade Nova de Lisboa

Pecsok, R. L., Shields, L. D., Cairns, T. e McWilliam, I. G. (1976). Modern methods of chemical analysis (2nd Ed.). Ed. John Wiley & Sons, Inc.