

Potencialidades das técnicas uni e multidimensionais de GC-TOF-MS para a caracterização de óleos essenciais

EDUARDO MATEUS¹, M.D.R. GOMES DA SILVA², JITKA ZROSTLÍKOVÁ³, HIGUINALDO CHAVES DAS NEVES⁴ E MARIA ROSA PAIVA¹

Resumo

Neste trabalho efectuou-se a separação e identificação dos componentes voláteis presentes em agulhas numa amostra compósita do óleo essencial de 11 espécies diferentes de pinheiros (*Pinus spp.*), após destilação-extracção simultânea. Foram utilizadas técnicas de cromatografia gás-líquido, uni e multidimensionais compreensivas (GCxGC), hifenadas a analisadores de massa de tempo de voo (TOF-“time-of-flight”). Demonstrou-se neste trabalho a potencialidade da utilização de técnicas uni e multidimensionais na separação e desconvolução espectral dos

analitos, conduzindo a identificações mais seguras, incluindo de compostos desconhecidos.

A caracterização do óleo essencial da matriz referida será uma ferramenta importante na descodificação do processo da escolha das árvores hospedeiras, por insectos herbívoros mediante comunicação olfactiva, nomeadamente pela “processionária ou lagarta do pinheiro” *Thaumetopoea pityocampa*.

1. Introdução

A análise de compostos voláteis em matrizes naturais, origina frequentemente cromatogramas complexos compostos por dezenas de picos, que em condições ideais devem ser separados. No entanto o desafio que se coloca ao analista perante uma análise de compostos voláteis não se limita apenas ao problema da capacidade cromatográfica, mas prende-se ainda com as semelhanças, quer estruturais quer das propriedades físico-químicas de muitos dos componentes destas misturas. Estes factos são os principais responsáveis pelas dificuldades de separação encontradas, que se traduzem nas conhecidas e muito frequentes co-eluições. As co-eluições dos componentes da mistura são impossíveis de detectar e identificar através de cromatografia-gás líquido de alta resolução-deteção por ionização de chama (GC-FID – “*flame ionisation detector*”) e em vários casos mesmo por

cromatografia-gás líquido unidimensional-espectrometria de massa (1D-GC-MS), onde apesar do uso de complexos processos de desconvolução, muitas das co-eluições permanecerão invisíveis para o operador. Um problema adicional resulta da vastíssima gama de concentrações em que os compostos voláteis se encontram presentes nas variadas matrizes. Consequentemente os componentes vestigiais podem nunca vir a ser detectados, se co-eluírem com compostos de concentração mais elevada, não sendo mesmo raro, que compostos presentes numa concentração reduzida constituam os compostos activos do ponto de vista biológico para uma dada matriz. Neste contexto, a caracterização do óleo essencial de diferentes espécies de pinheiros constitui uma ferramenta importante na descodificação do processo da escolha das árvores hospedeiras, por insectos herbívoros mediante comunicação olfactiva, nomeadamente

pelo desfolhador muito comum em Portugal “lagarta do pinheiro” *Thaumetopoea pityocampa*.

Os óleos essenciais, são amostras complexas, que possuem na sua constituição desde compostos muito voláteis (menos de 100 unidades de massa) até compostos semi-voláteis (300 unidades de massa). Estas amostras são fundamentalmente constituídas por compostos terpenóides, um grupo de compostos com muitas estruturas isómericas que originam espectros de massa, em Impacto Electrónico (EI), muito semelhantes ou idênticos, associados geralmente, do ponto de vista cromatográfico, em conjuntos complexos dentro de janelas estreitas de tempos de retenção [1]. Estas características ditaram a análise por GC de alta resolução como a técnica analítica de eleição, dado o seu forte poder separativo.

¹ GUECKO/DCEA, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-516 Caparica, Portugal

² Centro de Química Fina e Biotecnologia CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

³ LECO Application Laboratory Prague, Sokolovská 219, 190 00 Prague, Czech Republic

⁴ UBIA – Unidade de Biotecnologia Ambiental, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

Quando se pretende efectuar a separação e a identificação analíticas, em amostras complexas como os óleos essenciais, é importante observar, além da técnica separativa, a adequação da fase estacionária (selecção da “coluna certa”) onde essa separação poderá resultar mais eficaz, e ainda da instrumentação analítica (por exemplo selecção do sistema de injeção) e sistemas de detecção [2]. Como exemplo, a hifenação com infravermelho-transformada de Fourier (GC-FTIR “*gas chromatography – Fourier transform infrared*”) constitui uma técnica de identificação poderosíssima. No entanto esta técnica exige elevadas concentrações de soluto/analito e separações cromatográficas ideais a fim de se obterem espectros limpos com boas intensidades e assim se evitem co-eluições indesejáveis [3]. Estas condições tornam muito difícil a obtenção de bons espectros de FTIR, e inviabilizam uma aplicação efectiva desta técnica na identificação em amostras complexas, visto as condições enunciadas serem dificilmente alcançadas em simultâneo.

A GC-MS é hoje a técnica hifenada mais utilizada para fins de caracterização e identificação de óleos essenciais. Porém, apesar do contínuo desenvolvimento dos equipamentos, técnicas e métodos analíticos, uma separação total de todos os constituintes da mistura é hoje ainda, com frequência, prática e fisicamente inalcançável, devido à complexidade das amostras a analisar (elevado número de componentes, semelhanças estruturais, formas isoméricas e gamas largas de concentração dos analitos). São assim expectáveis fortes semelhanças entre índices de retenção de muitos dos analitos, independentemente da fase estacionária utilizada, levando à sua co-eluição. O emergir de novas técnicas de análise que maximizem a separação dos analitos, constituiu sempre uma evolução, que pode ser exemplificada através da cromatografia capilar como progressão natural da cromatografia de empacotamento, ou do surgimento das cromatografias gás-líquido em fases múltiplas, por acoplamento de colunas (MP-GC), multidimensional (MD-GC) e compreensiva (GCxGC) como extensão da cromatografia gás-líquido unidimensional. Qualquer

um destes avanços teve como propósito, conseguir mais “espaço cromatográfico” para se alcançar a adequada separação de todos os analitos presentes nas amostras [4,5]. Esta pretensão é, na prática, para separações realizadas em sistemas de uma dimensão, limitada física e estatisticamente pelo número máximo de pratos teóricos de uma coluna [6,7,8]. Assim, a capacidade de uma coluna capilar padrão (50 m x 0,25 mm, $d_f = 0,25\mu\text{m}$) poderá ser estimada pela equação 1.

$$n = \frac{\sqrt{N}}{4R} \cdot \ln\left(\frac{t_2}{t_1}\right) + 1 \quad (1)$$

Na eq.1 [6], em que **n** é o *factor de capacidade da coluna*, **N** é o *número de pratos teóricos efectivos da coluna*, **R** a *resolução* e **t₂** e **t₁** são a janela de retenção considerada, se $R = 1$, e admitindo que t_2/t_1 é 10, sabendo que um tempo morto típico de uma coluna de 50 m é de 100 s, onde esta coluna consegue separar, em 60 minutos, em condições ideais, 260 compostos (note-se que nestas condições o primeiro pico a ser eluído, sem perturbação do solvente, tem pelo menos um k' – factor de capacidade – de 3 e logo um tempo de retenção de 400 s). [8,9,10]

Esta limitação, da cromatografia unidimensional, é ainda mais evidente se aplicarmos a teoria estatística da sobreposição de componentes (*statistical theory of overlap* - STO) [5,8,11,12]. Na eq. 1 o *factor de capacidade (n)* de uma coluna constitui apenas o número máximo dos constituintes de uma amostra que o sistema cromatográfico poderá hipoteticamente separar. Estatisticamente este valor é manifestamente reduzido atendendo a que os analitos estarão aleatoriamente, e não discretamente, distribuídos ao longo do cromatograma final. Atendendo à elevadíssima complexidade de determinadas amostras, como as de óleos essenciais, que facilmente atingem uma centena de compostos numa muito variada gama de concentrações, será inevitável a co-eluição de alguns dos componentes. A utilização da STO (equação 2) permitiu mostrar como numa análise cromatográfica o *número de picos separados (S)* está relacionado com o *factor de capacidade*

(**n**) da coluna e com o *número total dos componentes (m)* presentes na amostra [5,8,11]:

$$S = m \exp\left(-\frac{2m}{n}\right) \quad (2)$$

A *probabilidade P*, que um dado componente tem de se apresentar no cromatograma final como um pico individual é igual a,

$$P = \exp\left(-\frac{2m}{n}\right) \quad (3)$$

A aplicação desta expressão conduz à necessidade teórica de se utilizarem colunas com capacidade para 290 analitos, de forma a garantir a separação de metade dos componentes presentes em amostras com 100 analitos [8]. Fica assim clara a limitação da cromatografia unidimensional, apesar do seu poder separativo, admitindo sempre condições ideais de separação, ou seja, inexistência de picos sem arrastamento (“tailing”), ruído do sistema e diferentes magnitudes de concentração dos analitos, que a STO não prevê [5].

A introdução das colunas capilares quirais para GC veio promover a necessidade da utilização da cromatografia multidimensional, na análise de óleos essenciais, pois revelou-se necessária a simplificação dos cromatogramas resultantes. A separação dos analitos agora também nos seus enantiómeros, conduziu ao aumento do número total de picos e a uma maior complexidade dos cromatogramas obtidos. Assim, surgiram sistemas de “*heart-cut*” (corte) como a “*live-T piece*” que permitem o isolamento do pico desejado, por transferência parcial da fracção de interesse de uma pré-coluna para uma segunda coluna, esta quiral, onde apenas os analitos alvo são cromatografados, promovendo a separação dos enantiómeros de um dado composto e eliminando as potenciais co-eluições protagonizadas pelos compostos rejeitados (não transferidos) [4,5]. Não obstante a sua comprovada eficácia, a MD-GC associada, ou não, a colunas quirais, é um método muito moroso com tempos de análise sempre muito elevados, o que não se compadece com as necessidades de rotina. Adicionalmente não são aconselháveis

transferências consecutivas numa janela estreita de tempos de retenção, já que os diferentes componentes a separar podem vir a co-eluir na segunda coluna.

Outro problema que se coloca na análise de amostras complexas contendo terpenóides, é o facto de serem muitas as formas isoméricas possíveis. É portanto expectável uma forte semelhança de espectros de massa e índices de retenção, para compostos distintos, o que dificulta seriamente o trabalho da identificação. A obtenção de espectros de elevada qualidade exige que o operador assegure que nenhuma co-eluição ocorra, e mesmo assim, a análise dos espectros obtidos deve ser prudente e rigorosa. A disponibilização comercial de bibliotecas de espectros cada vez mais completas e específicas, associadas a melhores algoritmos de cálculo, permitiram que a GC-MS seja actualmente a técnica, mais difundida na identificação de compostos. No entanto, são muitos os compostos não descritos nas bibliotecas comercialmente disponíveis, sendo por isso aconselhável cada laboratório construir a sua própria biblioteca de acordo com as condições do equipamento e tipo de detector de massa que utiliza. A conjugação destes dados espectrais com índices de retenção obtidos para colunas de polaridade diferentes, constitui em 1D-GC-MS um instrumento muito valioso na identificação de compostos [13,14].

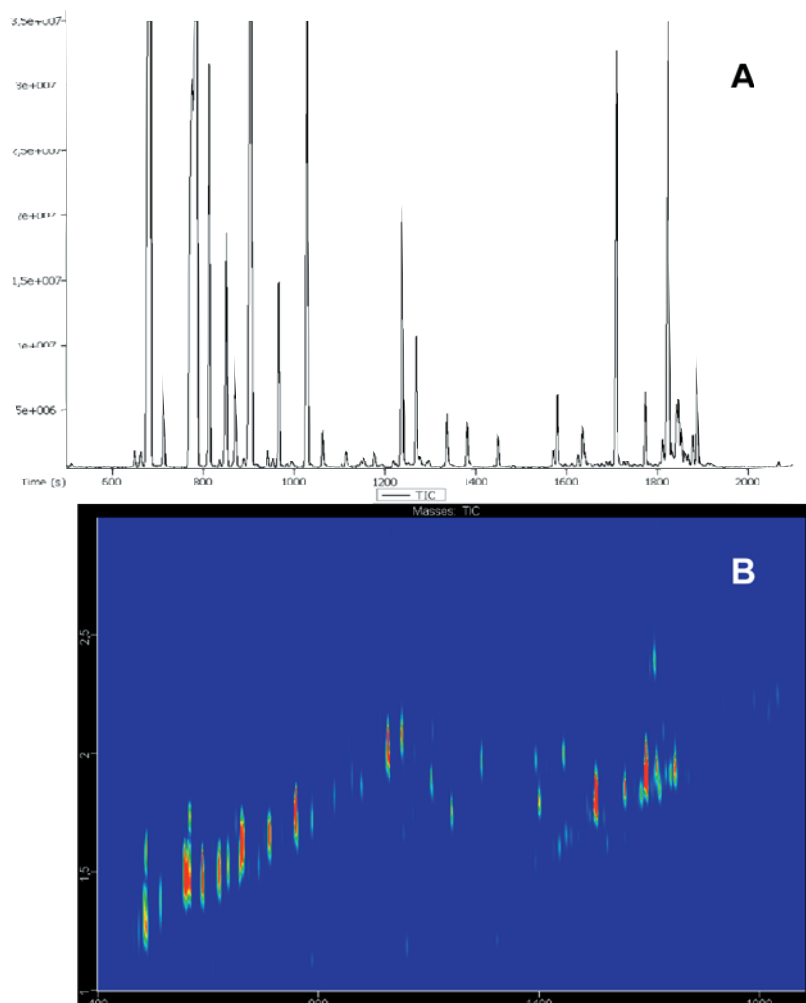
Os espectrómetros de massa são geralmente classificados com base nos seus analisadores de massa, sendo os instrumentos de GC-MS de mais comum utilização os quadropolos e os de armadilha de iões ("ion-trap") seguidos dos de sector magnético. Recentemente têm vindo a conquistar adeptos os GC-MS com analisador de massa de "time-of-flight" (GC-TOF-MS). Nas aplicações em GC o processo pelo qual a informação espectral é obtida, em relação ao eixo do tempo, pode ser classificada em "processos de varrimento" e "processos de array". Os instrumentos de sector magnético e de quadropolo, armadilha de iões são instrumentos de varrimento que produzem espectros de massa medindo sequencialmente a intensidade de cada m/z individual, na gama de massas seleccionada. Os analisadores de TOF, ba-

seados no facto de que após aceleração uniforme na fonte iónica, os iões vão chegando ao detector numa razão inversamente proporcional à sua massa, são instrumentos com detectores multicanal que medem a intensidade de todos os m/z , na gama de massas seleccionada, simultaneamente. A introdução do TOF-MS veio permitir a obtenção de espectros de massa, que independentemente da região do pico, se mantêm de perfil constante durante toda a sua eluição, devido à eliminação dos efeitos de distorção dos espectros de massa colectados em analisadores de massa de varrimento, consequentes da eluição dinâmica dos analitos. Devido à sua elevada taxa de extracção de iões que pode gerar até 500 espectros por segundo e à detecção simultânea de todos os iões, que garante a ausência de deformação espectral ao longo do pico, o TOF-MS permite, mesmo em perfis de co-eluição, a utilização com sucesso de algoritmos de desconvolução espectral e de detecção de picos e assim introduzindo uma verdadeira resolução espectral [15]. Estes algoritmos permitem resolver, com precisão, cada um dos compostos presentes na amostra em análise, mas não obstante, a variável operador é ainda mais importante do que anteriormente, no sentido de providenciar uma correcta utilização desta potente ferramenta. O TOF-MS permitindo uma maior velocidade de aquisição de dados potenciou finalmente a utilização de "fast" GC (GC em modo rápido) como metodologia analítica para amostras complexas em rotina, e abriu as portas à utilização de um novo modo de cromatografia multidimensional, chamada cromatografia compreensiva bidimensional (GCxGC) [15]. Um processo cromatográfico é considerado "compreensivo" se respeitar as seguintes condições: a transferência quantitativa e qualitativa de toda a amostra a analisar da primeira para a segunda coluna cromatográfica e o princípio da ortogonalidade, isto é, a independência total da separação entre os dois sistemas separativos [16]. Em GCxGC duas colunas diferentes estão conectadas em série, mediante uma interface apropriada, passando a amostra na sua totalidade pelas duas colunas ao longo da análise.

A interface entre as duas colunas é, regra geral, um modulador térmico [17,18]. O modulador em GCxGC recolhe a amostra que vai eluindo, após separação, da primeira coluna, e liberta-a rápida e sequencialmente, em pulsos curtos, na direcção da segunda coluna a um ritmo que permita a preservação e o fraccionamento ("*heart-cut*") total da separação original obtida na primeira dimensão. A este conjunto de tarefas chama-se modulação. Nesta operação cada pico eluído da primeira coluna é "partido" em diferentes segmentos (com a conservação da massa do pico original, mas com intensidades maiores que este), que focados em bandas estreitas, por acção do modulador, são injectados na segunda coluna, onde irão gerar um segundo cromatograma. O conjunto dos cromatogramas gerados na segunda coluna para cada segmento da amostra modulado constitui o cromatograma de GCxGC. O cromatograma de contornos ("*contour plot*") assim obtido, resulta da reconstrução através de software adequado dos cromatogramas lineares projectados na 2.^a dimensão em cada modulação. Estes são alinhados num plano bidimensional em que o eixo do X representa a separação na primeira coluna, o eixo do Y representa a separação na segunda coluna e o eixo do Z a intensidade de cada pico. Visto de cima, este cromatograma reconstruído apresenta-se ao observador na forma de contornos [18,19,20].

Os mecanismos de separação em ambas as colunas deverão ser sempre baseados em mecanismos de retenção diferentes e independentes (ex. volatilidade vs. polaridade), ou seja ortogonais, conduzindo à maximização das capacidades separativas individuais [16-20]. A segunda coluna de separação em GCxGC-TOFMS é, idealmente, de "fast" GC, com reduzidas dimensões de comprimento, diâmetro e espessura de filme, pelo que o tempo adicional de cromatografia em relação à cromatografia 1D não ultrapassará alguns segundos. O resultado final é, não só um aumento da sensibilidade, dada a focagem sucessiva a que os analitos estão submetidos, como também a um poderoso sistema de resolução, permitindo separar e identificar compostos de matrizes

figura 1 Cromatogramas obtidos para a amostra compósita do óleo essencial de agulhas de pinheiro. 1A: Cromatograma obtido por GC-TOF-MS (condições ver texto). 1B: Cromatograma de contornos resultante da análise por GC x GC (condições ver texto).



complexas sem prejuízo do tempo de análise [18,20].

Neste trabalho as técnicas de 1D-GC-TOFMS e de GCxGC-TOF-MS foram aplicadas no estudo da caracterização de uma amostra compósita de óleos essenciais provenientes da extracção-destillação simultânea de agulhas de 11 espécies de *Pinus*. São apresentados alguns dos resultados obtidos demonstrativos do poder de separação, identificação e resolução espectral destas técnicas (GC-TOFMS e GCxGC-TOFMS).

2. Materiais e Métodos

2.1 Padrões. À excepção do dissulfeto de isopropilo, todos os padrões dos compostos identificados nas figuras, foram adquiridos a Aldrich (Deisenhofen, Alemanha), Fluka (Neu-Ulm, Alemanha) e Kasei (Tokyo, Japão).

2.2 Material em estudo. As agulhas foram obtidas de 11 diferentes espécies de pinheiros, *P. pinea*, *P. pinaster*, *P.*

brutea, *P. elliottii*, *P. halepensis*, *P. kensya*, *P. radiata*, *P. patula*, *P. sylvestris*, *P. nigra* and *P. taeda*, plantados num talhão experimental no distrito de Abrantes (N39° 26'; W8° 04'), Portugal, em 1991. Após a recolha as amostras foram armazenadas e transportadas sob condições de refrigeração até ao laboratório, em sacos de plástico hermeticamente fechados. Todas as amostras foram extraídas por SDE (destilação e extracção simultâneas) nas 48 horas seguintes.

2.3 Destilação e extracção simultâneas (SDE). Cerca de 25 g de agulhas, não cortadas, de cada uma das espécies de pinheiro, foram colocadas num balão de 0.5 L com 350 mL de água bidestilada (Milli-Q RG™, Millipore, Molsheim, França), acoplou-se um aparelho de extracção “Veith and Kiwus” para destilação por arrastamento de vapor e extracção por solvente simultâneos. A extracção foi efectuada durante 2 horas com 10 mL de 2:1 v/v pentano / éter etílico (p.a. E. Merck, Darmstadt, Alemanha). O re-

síduo foi seco sobre sulfato de magnésio (E. Merck, Darmstadt, Alemanha) e concentrado até um volume final de 1 mL sob uma suave corrente de azoto (Air Liquide, Lisbon, Portugal). Uma alíquota de 1 µL de um compósito das 11 variedades de pinheiro foi utilizada para a análise cromatográfica.

2.4 GC-TOFMS. A cromatografia gás-líquido foi realizada utilizando um cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) acoplado a um espectrómetro de massa Leco Pegasus III TOFMS (Leco Corp., St. Joseph, MI, EUA). A injeção de 1 mL foi realizada com partição de fluxo de 1:50 a 250 °C. O gás de arrastamento foi hélio a 1,0 mL/min a fluxo constante. Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico, com uma energia da fonte iónica de 70 eV, com a fonte a 220 °C e interface a 280 °C A velocidade de aquisição de dados foi de 7 Hz. Os equipamentos foram controlados pelo software ChromaTOF (Leco Corp.,

St. Joseph, MI, EUA) que efectuou também o processamento dos dados. A coluna foi uma DB-5MS de 15 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (J&W Scientific, Folsom, EUA), sendo a programação do forno inicial de 30 °C durante 2 minutos seguindo de uma rampa a 4 °C/min até aos 250 °C onde se mantém durante 10 minutos.

2.5 GC x GC – TOFMS de monoterpenos. A cromatografia gás-líquido compreensiva (GC x GC) foi realizada utilizando um sistema Leco Pegasus 4D GC x GC – TOFMS (Leco Corp., St. Joseph,

MI, EUA), constituído por um cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com um forno secundário e um modulador dual-stage jet e acoplado a um espectrómetro de massa Leco Pegassus III TOFMS. A injeção de 1 mL foi realizada com uma partição de fluxo de 1:100 a 250 °C. O gás de arrastamento foi hélio a 1,0 mL/min a fluxo constante. Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico, com uma energia da fonte iónica de 70 eV, com a fonte a 220 °C e a interface a 280 °C. A velocidade de aquisição de

dados foi de 125 Hz. A temperatura de modulação foi colocada a 20 °C, e o ciclo de modulação foi de 3 s (com 0,6 s de pulso de aquecimento). Os equipamentos foram controlados pelo software ChromaTOF (Leco Corp., St. Joseph, MI, EUA) que efectuou também o processamento dos dados. As colunas utilizadas foram uma DB-5MS de 15 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (J&W Scientific, Folsom, EUA) para a 1.ª dimensão e uma coluna BPX-50 de 1 m x 0,1 mm x 0,1 μ m (Agilent, Michigan, EUA) para a 2.ª dimensão. O programa de temperaturas foi o seguinte: forno principal 35 °C durante 2

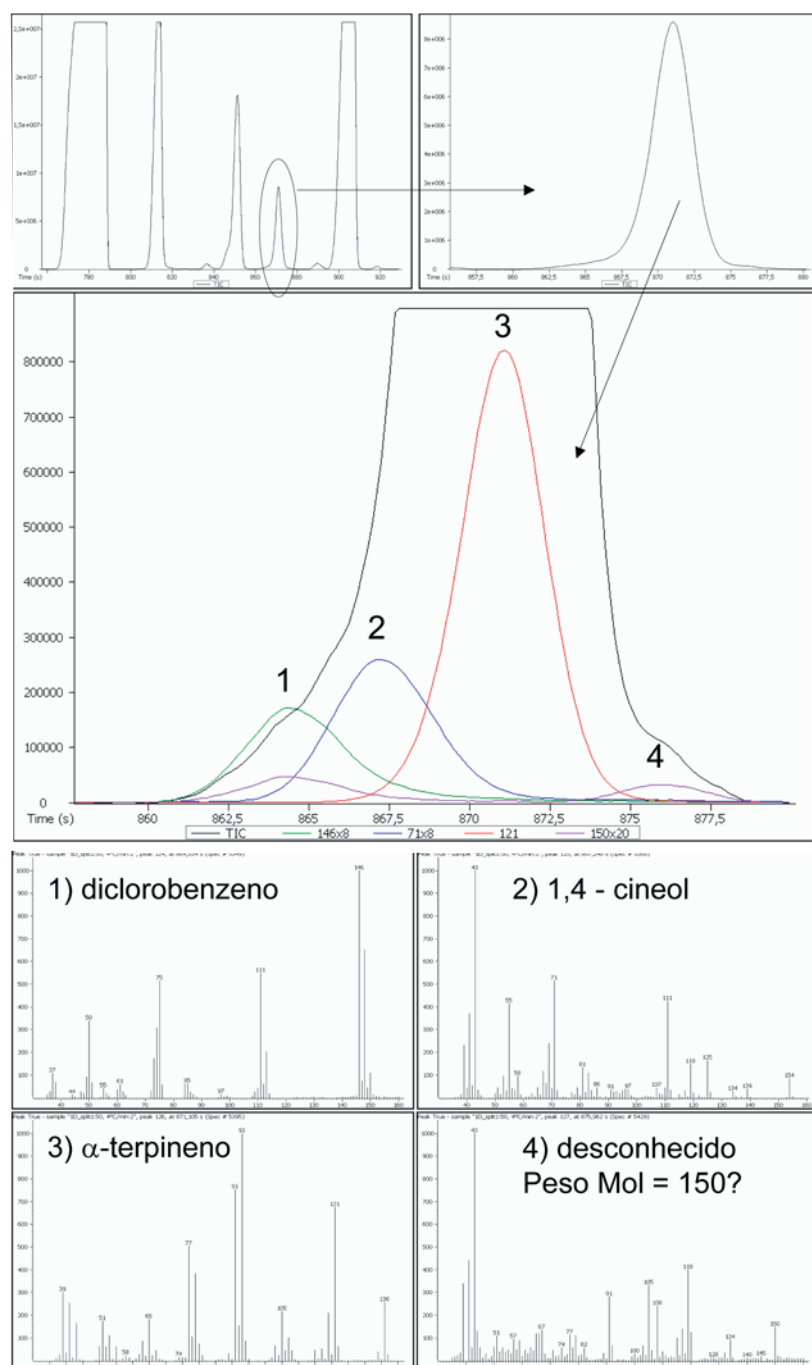


figura 2 Detalhe de zona com co-eluição do cromatograma da figura 1A, após aplicação dos algoritmos de desconvolução espectral e detecção de picos. Indica-se as identidades afectadas a cada um dos componentes detectados com os respectivos espectros de massa.

minutos seguido de uma rampa de 4 °C/min até 250 °C, mantendo-se a essa temperatura durante 2 min. O forno secundário: temperatura inicial 40 °C, 2 min, seguido de uma rampa de 4 °C/min até 255 °C onde se mantém 2 min.

Cromatografia quiral: Na 1.ª dimensão foi utilizada uma coluna de 23 m x 0,25 mm i.d. revestida com 0,25 µm de espessura de filme de 15% de heptaquis (2,3-di-O-metil-6-O-*terc*-butildimetilsililo-β-ciclodextrina sobre SE 52 (DiMe)); na 2.ª dimensão foi utilizada uma coluna Supelwax de 2,5 m x 0,1 mm x 0,1 µm (Supelco, Belfonte, EUA). O programa de temperaturas foi o seguinte: forno principal 40 °C durante 1 minuto seguido de uma rampa de 2 °C/min até 200 °C, mantendo-se a essa temperatura durante 2 min. O forno secundário: temperatura inicial 50 °C, 1 min, seguido de uma rampa de 2 °C/min até 210 °C onde se mantém 2 min. Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico, com uma energia da fonte iónica de 70 eV, com a fonte a 220 °C e a interface a 250 °C. A velocidade de aquisição de dados foi de 100 Hz. A

temperatura de modulação foi colocada a 30 °C, e o ciclo de modulação foi de 5 s (com 1,75 s de pulso de aquecimento).

3. Resultados e Discussão

A amostra sob caracterização, foi uma amostra compósita obtida a partir de 11 extractos individuais de óleo essencial de 11 espécies de pinheiro no sentido de obter uma amostra representativa da composição total das espécies de pinheiro em estudo. Esta amostra foi sujeita a dois tipos de análise: Análise por 1D-GC-TOF-MS e GCxGC-TOF-MS. As figuras 1A e 1B ilustram os cromatogramas tipo obtidos para uma amostra de *Pinus (spp)*, depois da análise em 1D-GC-TOF (cromatograma de corrente iónica total) e GCxGC (cromatograma de contornos). Na figura 1B o eixo dos X representa os tempos de retenção da separação na 1.ª dimensão, em minutos (na prática a separação da figura 1A). O eixo dos Y representa os tempos de retenção da separação, em segundos, na segunda coluna (fast GC) ou 2.ª dimensão (ver materiais e métodos), obtida para cada fracção modulada de 5 se-

gundos do cromatograma 1A. A separação exibida no cromatograma de contornos reflecte a natureza das duas dimensões de separação e é essencialmente uma representação dos componentes da amostra nas coordenadas volatilidade versus polaridade (DB-5 versus PBX-50). Uma das características importantes do TOF-MS é mostrada na figura 2 que exhibe o resultado da aplicação dos algoritmos de desconvolução espectral e de detecção de picos ("mass spectral deconvolution" e "peak find") em 1D-GC-TOF-MS, numa zona de co-eluição do cromatograma da figura 1A. Não obstante a simetria do pico seleccionado, os algoritmos são capazes de reconhecer variações mínimas em espectros sobrepostos, detectar a co-eluição de quatro compostos e assim proceder à sua separação. A desconvolução espectral, executada pelo algoritmo, permite identificar 3 dos 4 compostos (como se indica na figura 2). A figura 3 exhibe a mesma zona de co-eluição, da figura 2, após análise por GCxGC, confirmando-se a presença dos 3 compostos anteriormente observados, sendo que o quarto composto não identificado, resulta na

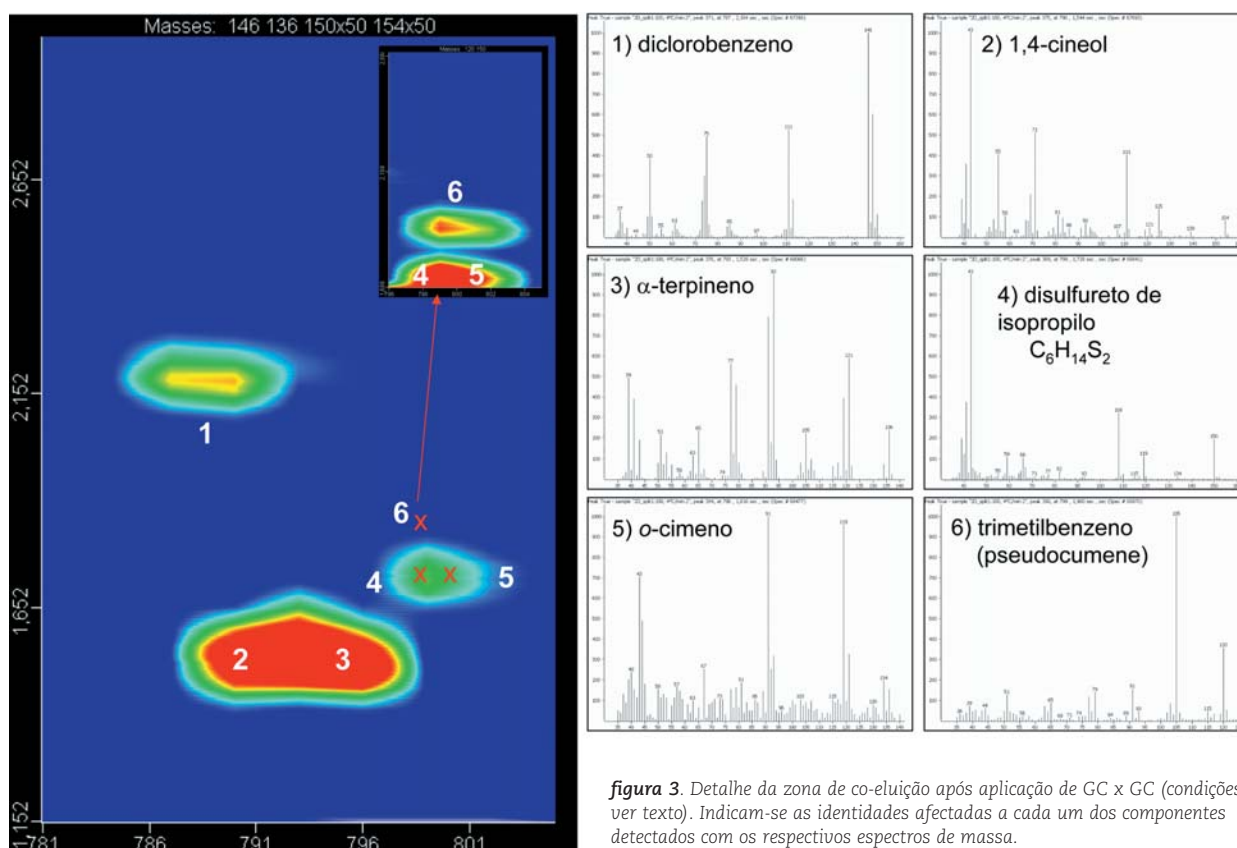


figura 3. Detalhe da zona de co-eluição após aplicação de GC x GC (condições ver texto). Indicam-se as identidades afectadas a cada um dos componentes detectados com os respectivos espectros de massa.

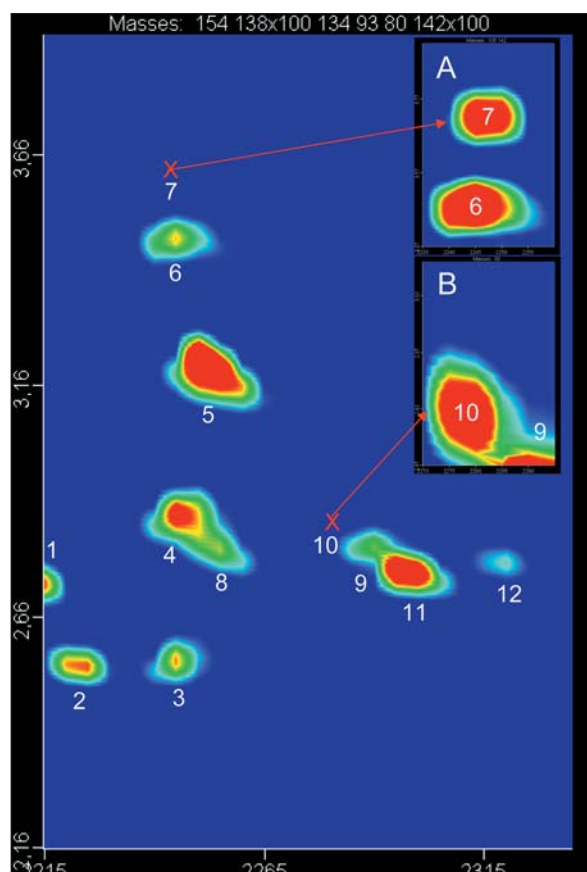


figura 4 GC x GC com a primeira coluna quiral (condições ver texto). Pico 1: α -terpineno; pico 2: (-)-carvomenteno; pico 3: (-)-carvomenteno; pico 4: 1,8-cineol; pico 5: cimeno (isómero); pico 6: acetato de hexen-2-ilo; pico 7: 1,2,4-trimetilbenzeno; pico 8: (-)-limoneno; pico 9: (-)- β -felandreno; pico 10: trans-ocimeno; pico 11: (+)-limoneno; pico 12: (+)- β -felandreno.

realidade da co-eluição de 3 compostos, em concentrações vestigiais, detectáveis agora por GCxGC em virtude do aumento da sensibilidade (após modulação), do poder de separação analítico e da resolução espectral. Noutro exemplo, em análise quiral, a figura 4 mostra o cromatograma de contornos obtido por GCxGC na análise quiral de monoterpénos, estando os picos identificados na legenda da figura. Os picos de 3 a 8 apresentam em 1D-GC, total ou parcial co-eluição, sendo apenas possível a sua separação nestas condições cromatográficas por GCxGC.

Utilizando GCxGC-TOF-MS separou-se e identificou-se uma grande variedade de compostos, entre monoterpénos, sesquiterpénos, terpenóides oxigenados, e voláteis inferiores – fundamentalmente álcoois, aldeídos e ésteres de baixa massa molecular ou “voláteis verdes” (“*green volatiles*”), muitos dos quais não seriam directamente visualizados e identificados por 1D-GC-TOF-MS sem o recurso dos algoritmos de desconvolução.

Com a utilização do GC-TOF-MS foi possível uma resolução espectral tal, que permitiu, em casos de co-eluição, a ob-

tenção de espectros viáveis, passíveis de identificação e quantificação. A utilização de GCxGC permitiu incrementar a separação analítica dos componentes da amostra em estudo. A sua hifenação com TOF-MS reuniu as duas vantagens, resolução espectral e maximização separativa, resultando uma poderosíssima ferramenta para a caracterização de óleos essenciais.

A aplicação destas técnicas à análise de óleos essenciais permitirá, não só alcançar os objectivos tradicionais desta área como a caracterização, o controlo de qualidade, e os estudos de taxonomia química entre outros, mas também avançar, na investigação das relações entre níveis tróficos, designadamente entre insectos fitófagos e plantas hospedeiras. É possível acoplar a um GC um aparelho de electro-antenografia (que regista a resposta sensorial dos insectos aos estímulos dos compostos voláteis que vão sendo separados), e descodificar assim com exactidão quais os sinais com efeito biológico.

Os campos de aplicação da GC-TOF-MS e da GCxGC-TOF-MS são múltiplos, não se esgotando nos óleos essenciais, po-

dendo estender-se à análise de outros tipos de amostras complexas, no âmbito ambiental, alimentar, forense, petroquímico e biológico.

Agradecimentos

Os autores desejam agradecer ao Eng.º Rui Rocha da LECO Instrumentos S.A. e à LECO Corporation por todo o apoio logístico prestado e pelo acesso ao sistema Pegasus 4D. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projecto da União Europeia PROMOTH (Contracto n.º: QLK5-CT-2002-00852) e pelo projecto POCTI/QUI/305/94/2001.

Bibliografia

- [1] R.P. Adams, in Identification of Essential Oil Components by GC/MS, Allured Publishing Corporation, 1995.
- [2] P. Sandra, M. Proot, G. Diricks, F. David, in Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, P. Sandra, C. Bicchi, Huething Verlag, 1987, p.29.
- [3] S.L. Smith, in Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, P. Sandra, C. Bicchi, Huething Verlag, 1987, p.367.

- [4] F. David, P. Sandra, in *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, P. Sandra, C. Bicchi, Huething Verlag, 1987, p.387.
- [5] W. Bertsch, *Journal of High Resolution Chromatography*, 22, 12 (1999) 647.
- [6] E. Grushka, *Analytical Chemistry*, 42, 11(1970), 1142.
- [7] H. J. Chaves das Neves, A. M. Costa Freitas, in *Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*, Dias de Sousa Ltda., 1996.
- [8] K.D. Bartle, in *Multidimensional Chromatography*, L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle, John Wiley & Sons Ltd., 2002, p. 3-15.
- [9] K. Grob Jr, G. Grob, K. Grob, *Journal of Chromatography*, 156 (1978), 1.
- [10] K. Grob, G. Grob, K. Grob Jr., *Journal of Chromatography*, 219 (1981), 13.
- [11] J.M. Davis, J.C. Giddings, *Analytical Chemistry*, 55 (1983), 418.
- [12] M. Martin, D.P. Herman, G. Guiochon, *Analytical Chemistry*, 58 (1986), 2200.
- [13] T. Shibamoto, in *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, P. Sandra, C. Bicchi, Huething Verlag, 1987, p.259.
- [14] G. Vernin, M. Petitjean, J. Metzger, D. Fraisse, K.N. Suon, C. Scharff, in *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, P. Sandra, C. Bicchi, Huething Verlag, 1987, p.287.
- [15] J.F. Holland, B.D. Gardner, in *Flavor, Fragrance and Odour Analysis*, R. Marsili, Marcel Dekker, 2002, p. 107.
- [16] P. Schoenmakers, P. Marriott, J. Beens, *LC•GC Europe* June 2003, 1.
- [17] J.B. Phillips, J. Beens, *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 331..
- [18] P. Marriott, R. Shellie, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 9 e10 (2002), 573.
- [19] J.M.D. Dimandja, *American Laboratory*, 35 (2003) 42.
- [20] J. Dalluge, J. Beens, A.Th. Brinkman, *Journal of Chromatography A*, 1000(2003), 69.

Actualidades Científicas

O Processo GASLESS

Investigadores da Universidade de Nottingham, Inglaterra, desenvolveram um novo processo contínuo de hidrogenação que não necessita de gases para que a reacção ocorra (processo GASLESS). A tecnologia proposta consiste na decomposição de ácido fórmico líquido (HCO_2H), a 450°C , usando um catalisador de platina ou de paládio num primeiro reactor, obtendo-se H_2 e CO_2 supercrítico. Os produtos da decomposição são misturados com o substrato a hidrogenar e enviados a um segundo reactor, contendo um catalisador metálico.

A mistura H_2/CO_2 produzida no processo GASLESS no primeiro reactor, permite hidrogenar substratos como o ciclohexeno ou o 1-octeno no segundo reactor. A decomposição do HCO_2H produz H_2 e CO_2 numa razão 1:1. Alimentando formato de etilo líquido ($\text{HCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) no primeiro reactor, obtém-se CO_2 e etano. A decomposição paralela de HCO_2H e $\text{HCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ permite controlar a concentração de H_2 na mistura supercrítica $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_6$.

A decomposição de $\text{HCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ na ausência de HCO_2H abre possibilidades para a realização de outras reacções em fluidos supercríticos. Os mentores do processo (Professor Martin Poliakoff e o pos-doc Jason Hyde), demonstraram, por exemplo, que o equipamento pode ser usado para alquilações Friedel-Craft catalisadas em meio ácido.

Este processo irá certamente revolucionar a indústria da química fina, uma vez que permite reduzir os riscos inerentes à manipulação de recipientes contendo gás a alta pressão. Existem no entanto alguns problemas por resolver. Por exemplo, a decomposição do HCO_2H conduz à geração de pequenas quantidades de monóxido de carbono e água. Se esta decomposição não for controlada, a concentração de CO nos gases gerados irá aumentar. Os investigadores procuram agora estudar como é que a presença de CO na mistura H_2/CO_2 pode ser aproveitada em reacções de hidrogenação em meio supercrítico (adaptado de *Chemical & Engineering News* (2004) **82** (24), 12).

Helder Gomes

Novo Material para a Separação de Hidrogénio

O Professor Jerry Atwood e o Dr. Agoston Jerga da Universidade de Missouri, EUA, em colaboração com o Professor Leonard Barbour da Universidade de Stellenbosch, África do Sul, descobriram que cristais não porosos de um dímero calixareno absorvem e retêm selectivamente CO, CO_2 e outros gases, rejeitando H_2 (Atwood *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004), 43, 2948). O fenómeno observado permite que os cristais orgânicos possam ser usados para purificar hidrogénio em células de combustível, à semelhança do carvão activado e dos zeólitos.

Em trabalhos anteriores com calixarenos, os investigadores observaram que o p-tert-butilcalix-4-areno forma uma fase cristalina na qual moléculas em forma de chávena dimerizam. Os lados abertos das “chávenas” juntam-se através de interacções de van der Waals, formando-se uma cavidade. Descobriram que os cristais podiam absorver líquidos como o brometo de vinilo, confinando as moléculas nas cavidades.

Em novas experiências, os investigadores observaram que os cristais também absorvem gases quando armazenados em ar. Descobriram esta característica quando os cristais de calixareno foram submersos em nitrobenzeno, libertando-se ar. Estudos posteriores revelaram que os cristais expostos a cerca de 1 atm de CO_2 absorvem o gás até a sua pressão baixar a cerca de 0.05 atm. Os cristais absorvem também CO, N_2 e O_2 , mas não tão rápido ou tanta quantidade como o observado para o CO_2 . Mas, o fenómeno mais interessante que a equipa observou foi que os cristais de calixareno absorvem CO_2 de uma mistura CO_2/H_2 , rejeitando o H_2 .

O hidrogénio produzido a partir de água e CO na reacção de “water-gas shift” é contaminado com CO e CO_2 , sendo a separação do H_2 complicada e cara. Embora ainda não se compreenda como os calixarenos não porosos absorvem gases, o material é promissor para a purificação do H_2 .

Helder Gomes