

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DE ÓLEOS VOLÁTEIS: ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE MISTURAS DE SESQUITERPENOS**

Cláudia B. Brochini, Cecília V. Núñez, Isabel C. Moreira e Nidia F. Roque\*

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05599-970 - São Paulo - SP

Mariana H. Chaves

Departamento de Química - Universidade Federal do Piauí - Ininga - 64049-550 - Teresina - PI

Dirceu Martins

Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia - Campus Universitário de Ondina - Federação - 40170-290 - Salvador - BA

Recebido em 31/10/97; aceito em 12/5/98

**IDENTIFICATION OF COMPONENTS FROM VOLATILE OILS: SPECTROSCOPICAL ANALYSIS OF SESQUITERPENES MIXTURES.** This paper describes a chromatographic method to fractionate volatile oils and to identify their sesquiterpenic constituents. The fractionation process includes flash chromatography over silica gel and chromatography over silica gel/AgNO<sub>3</sub>, utilising pentane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and/or acetone as eluents. GC chromatograms were obtained in order to get the relative percentage of each constituent in the volatile oils, to get the retention time value of them as well as to analyse and combine the fractions eluted from the columns. Such procedure afford mixtures of sesquiterpenes which are analysed by GC/MS, <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR.

**Keywords:** volatile oil; chromatographic methods; <sup>13</sup>C NMR of sesquiterpenes.

## 1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos trabalhos com óleos voláteis existentes na literatura descreve a identificação de seus constituintes através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e/ou associada ao cálculo do índice de Kovatz. O uso desta técnica requer bancos de dados que contenham os valores dos tempos de retenção e/ou os espectros de massas para serem confrontados com os dados experimentais obtidos. Tais dados nem sempre estão disponíveis e muitas vezes sequer existem. No caso de sesquiterpenos, as análises por CG/EM não têm se mostrado eficientes uma vez que tais substâncias rearranjam-se facilmente formando fragmentos com m/z iguais, o que origina espectros que diferem apenas quanto às intensidades relativas dos picos<sup>1</sup>. Além disso, existe muita variação entre espectros obtidos em instrumentos diferentes.

A RMN de <sup>13</sup>C parece ser a técnica espectroscópica mais indicada para a identificação dessas substâncias, uma vez que os sesquiterpenos constituem uma classe de substâncias naturais com uma gama muito grande de possibilidades estruturais. Um fator limitante para o uso de tal técnica é a existência de poucos dados de RMN de <sup>13</sup>C disponíveis na literatura, os quais possam ser empregados como modelos, especialmente quando se trata de sesquiterpenos sem oxigenação ou mono-oxigenados, ou seja, aqueles que comumente fazem parte dos óleos voláteis. Apesar desta dificuldade, a utilização da metodologia aqui descrita tem proporcionado a identificação de vários sesquiterpenos, inclusive alguns inéditos.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Separação dos constituintes

Primeiramente deve-se analisar o cromatograma obtido por CG do óleo volátil bruto\*. Os valores dos tempos de retenção, obtidos em condições cromatográficas preestabelecidas, indicarão se os constituintes são predominantemente hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos mono-oxigenados, di-oxigenados e eventualmente diterpenos<sup>2,3</sup>. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H deverá confirmar a predominância da natureza terpênica do

óleo já que aril-propanóides também são componentes frequentes de óleos voláteis.

A seguir o óleo volátil deve ser submetido a uma cromatografia rápida em coluna de sílica gel, utilizando-se para tal um sistema sob pressão. Os solventes utilizados como eluentes devem ser de baixo ponto de ebulição, como pentano e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Misturas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH podem ser utilizadas ao final do processo, desde que o álcool esteja presente em pequena proporção. As frações obtidas desse primeiro fracionamento cromatográfico serão reagrupadas após a análise dos cromatogramas de cada uma delas, obtidos por CG. Para a reunião deve-se considerar a proporção de cada um dos constituintes das diversas frações, a fim de que sejam obtidas misturas com diferentes proporções dos mesmos constituintes. Isso favorece a análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C, uma vez que facilita a identificação dos sinais pertencentes a cada um dos sesquiterpenos presentes nas misturas. Através desse procedimento é possível identificar diversos componentes, mesmo aqueles presentes em pequenas concentrações, sem necessidade de purificá-los.

As frações de menor polaridade devem ser reunidas e submetidas a uma cromatografia em coluna de sílica gel impregnada com AgNO<sub>3</sub><sup>4</sup>, já que essas são normalmente constituídas por sesquiterpenos com uma ou mais ligações duplas. A maior ou menor disponibilidade dos elétrons dessas ligações fará com que os terpenos sejam diferencialmente retidos pelo AgNO<sub>3</sub> e logo eluídos separadamente. Aqueles com maior número de ligações duplas serão eluídos por último. Os eluentes utilizados também devem ter baixo ponto de ebulição, sendo que os mais indicados são pentano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e acetona. As frações mais polares que contenham terpenos com grupamentos hidroxílico, cetônico ou anel epóxido, por serem um pouco menos voláteis, podem ser submetidas às técnicas cromatográficas usuais. Em qualquer um dos casos deve-se monitorar o fracionamento por cromatografia a gás.

### \* Análises cromatográficas

As condições utilizadas nos trabalhos do grupo para as análises cromatográficas foram: Cromatógrafo HP-5890 Series II. Coluna capilar HP-5 (5% de fenil em 95% de metil silicone, 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura

do filme). Condições: injetor automático HP 7673 (razão de divisão 1:50); 180°C; detector por ionização de chama: 260°C; gás carreador: H<sub>2</sub>, vazão: 6 mL/min (30°C); temperaturas programadas: 100°C (2 min) - 100 -240°C (5°C/min) - 240°C (5 min).

## 2.2. Identificação dos sesquiterpenos

Para a análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C das misturas sesquiterpênicas seguiu-se a metodologia descrita para misturas de triterpenos<sup>5,6</sup>. Esse método sugere que sinais de intensidades semelhantes, relativos a átomos de carbono ligados ao mesmo número de hidrogênios, devam pertencer à mesma substância. Desta forma é possível agrupar os sinais de cada constituinte da mistura desde que eles não estejam presentes na mesma proporção. A porcentagem relativa de cada um dos constituintes é dada pelo cromatograma da mistura obtido por CG.

A determinação do tipo de esqueleto carbônico da molécula é um passo importante no processo de elucidação estrutural. Sesquiterpenos possuem uma gama muito grande de possibilidades estruturais e, por serem moléculas pequenas, qualquer alteração na estrutura ocasiona variações consideráveis nos valores de deslocamentos químicos de vários átomos de carbono da molécula, o que torna difícil a associação desses valores a um tipo único de esqueleto carbônico.

A fórmula molecular do composto, assim como o número de deficiência de hidrogênios da estrutura de cada sesquiterpeno, são deduzidos a partir do espectro de massas associado ao tempo de retenção e ao espectro de RMN de <sup>13</sup>C. Embora o pico correspondente ao íon-molecular possa, no caso, ser suficiente para a determinação da fórmula molecular, ele nem sempre está presente nos espectros de massas dos sesquiterpenos hidroxilados, devido a perda de água. Nesses casos, o valor do tempo de retenção é usado para definir a presença de oxigênio na molécula<sup>2</sup>. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C revela o número de ligações duplas da molécula, através dos sinais relativos a átomos de carbono sp<sup>2</sup>, sendo então possível determinar o número de anéis da estrutura, uma vez que a fórmula molecular esteja estabelecida. Este dado, juntamente com o número de grupos metílicos, metilênicos, metínicos

e de átomos de carbono quaternários, também obtidos pelos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (PND e DEPT), indica as possibilidades estruturais do esqueleto sesquiterpênico. Um levantamento bibliográfico mostrará quais tipos de esqueletos carbônicos possuem as características apontadas por essa análise<sup>7</sup>.

A seguir os espectros de RMN de <sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H bem como o espectro de massas devem ser avaliados mais detalhadamente. Assim, a presença de anéis ciclopropânicos, grupos isopropílicos, grupos metílicos ligados a grupo CH, a átomos de carbono sp<sup>2</sup> ou quaternários, além de outras funções, podem ser detectadas na estrutura molecular. Estes dados também são relevantes para se concluir qual o tipo de esqueleto dos sesquiterpenos analisados. Deve-se então comparar os dados de RMN de <sup>13</sup>C obtidos com os fornecidos pela literatura. Quando esses não são encontrados, torna-se necessária a utilização de diversas estruturas como modelos para que uma atribuição correta dos valores de deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C seja feita. Mesmo assim, nem sempre existem modelos adequados, principalmente para os sesquiterpenos sem oxigenação<sup>7</sup>.

## 3. APLICAÇÃO

Utilizando-se a metodologia descrita, dez sesquiterpenos foram identificados no óleo volátil da casca do tronco de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae): β-1(10)-epóxi-β-cariofil-4(15)-eno (**1**), α-1(10)-epóxi-β-cariofil-4(15)-eno (**2**), 1(10)-epóxi-humula-4,7-dieno (**3**), cariofila-1(10),4(15)-dieno (**4**), germacra-1(10),4(15),5-trieno (germacreno D, **5**), *cis*-cadinina-4,10(14)-dieno (γ-muuroлено, **6**), *trans*-cadinina-4,10(14)-dieno (**7**), cadina-1(10),4-dieno (δ-cadineno, **8**), elema-1,3,11-trieno (β-elemeno, **9**), humula-1(10),4,7-trieno (α-humuleno, **10**)<sup>8</sup>. A Tabela 1 mostra o reagrupamento das frações provenientes do fracionamento do óleo volátil bruto, em colunade sílica gel impregnada com AgNO<sub>3</sub>, assim como os constituintes de cada uma delas com os seus respectivos tempos de retenção. As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, os cromatogramas e os espectros de RMN de <sup>13</sup>C para os Grupos IV e V.

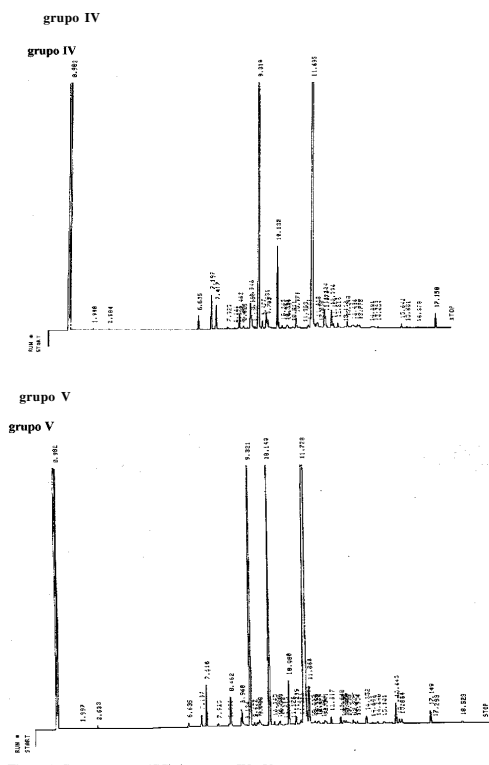


Figura 1. Cromatogramas (CG) dos grupos IV e V.

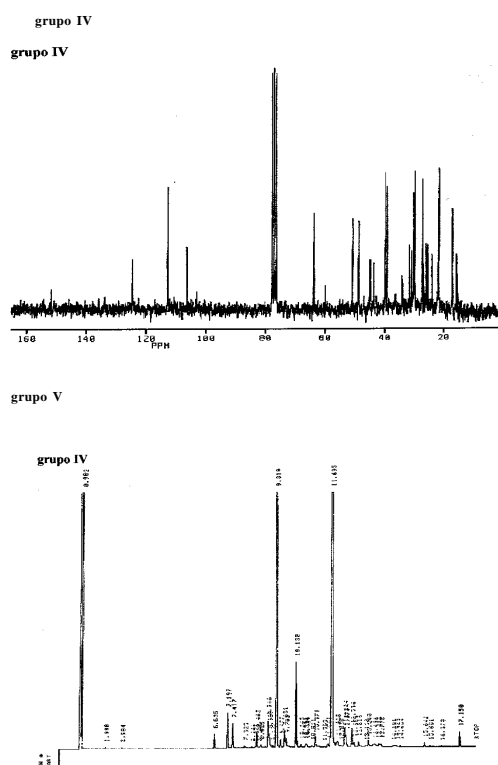
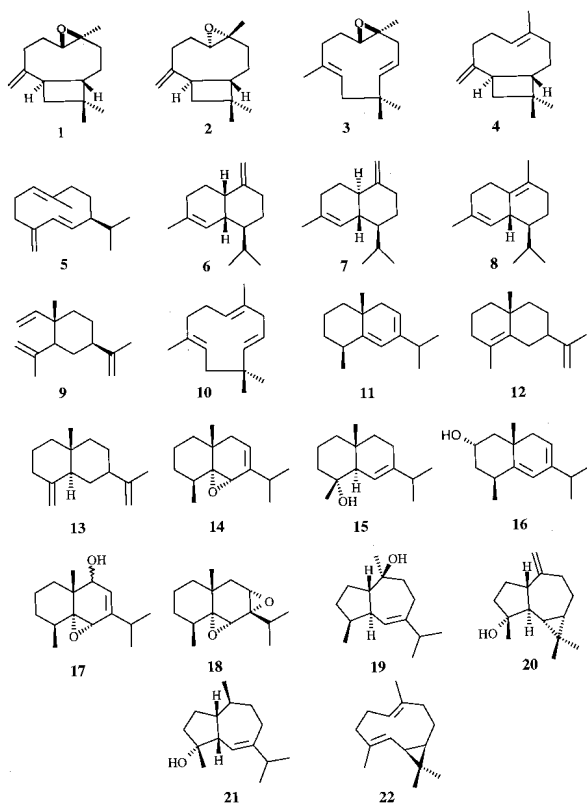


Figura 2. Espectros de RMN <sup>13</sup>C (PND, CDCl<sub>3</sub>) dos grupos IV e V.

**Tabela 1.** Fracionamento cromatográfico do óleo volátil da casca do tronco de *G. guidonia*.

Grupo	Frações reunidas	t <sub>R</sub> (min.)	% relativa (frações)	% relativa (óleo bruto)	Substâncias identificadas
I	1 e 2	-	-	-	mistura complexa
II	3	7,10	7,5	-	-
		9,81	9,5	-	-
		10,35	39,0	5,0	<b>8</b>
		10,76	6,0	-	-
III	4 e 5	-	-	-	mistura complexa
		6	23,0	4,0	<b>6</b>
IV	6	10,13	5,0	2,5	<b>7</b>
		11,69	48,5	5,0	<b>1</b>
		9,31	18,0	-	<b>6</b>
V	7 e 8	10,13	11,0	-	<b>7</b>
		11,69	54,0	-	<b>1 e 2</b>
VI	9 e 10	9,31	12,0	-	<b>6</b>
		10,13	18,0	-	<b>7</b>
		11,61	13,0	-	<b>2</b>
		11,69	20,0	-	<b>1</b>
VII a XII	11 a 27	-	-	-	misturas complexas
XIII	28 e 29	9,50	11,0	-	-
		9,70	8,5	-	-
		12,26	59,0	2,0	<b>3</b>
		13,34	5,5	-	-
XIV	30	-	-	-	mistura complexa
XV	31 a 38	8,06	36,5	25,0	<b>4</b>
		9,41	40,0	24,0	<b>5</b>
XVI	39 a 45	8,06	56,0	-	<b>4</b>
		9,41	40,0	-	<b>5</b>
XVII	46 a 58	-	-	-	mistura complexa
XVIII	59	7,44	25,0	2,0	<b>9</b>
		8,76	21,0	8,5	<b>10</b>



Os óleos voláteis das espécies descritas abaixo também foram analisados através desta metodologia, tendo sido identificados os seguintes sesquiterpenos:

*G. guidonia*, folhas: 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -eudesma-5,7-dieno (**11**); 7 $\beta$ ,14 $\beta$ -eudesma-4,11-dieno (**12**); 7 $\beta$ ,14 $\beta$ -eudesma-4(15);11-dieno (**13**); 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epóxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -eudesm-7-eno (**14**); 14 $\beta$ -eudesm-6-en-4 $\alpha$ -ol (**15**); 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -eudesma-5,7-dien-2 $\alpha$ -ol (**16**); 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epóxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -eudesm-7-en-9-ol (**17**); 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -diepóxi-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -eudesmane (**18**) e guaia-6-en-10 $\beta$ -ol (**19**)<sup>3</sup>.

*Xylopia emarginata* Mart (Annonaceae), folhas: cariofileno (**1**); epóxicariofileno (**1**), espatulenol (**20**) e alismol (**21**)<sup>9</sup>.

*X. emarginata*, frutos: germacreno D (**5**), espatulenol (**20**) e alismol (**21**)<sup>9</sup>.

*Porcelia macrocarpa* (Warm.) R.E. Fries (Annonaceae), folhas: espatulenol (**20**), germacreno D (**5**) e biciclogermacreno (**22**)<sup>10</sup>.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se observar que, através desta metodologia, foi possível detectar substâncias com diferenças estruturais muito sutis, como por exemplo os sesquiterpenos **1** e **2**. Vale a pena ressaltar que **2** não tinha sido, até então, detectado como produto natural, mas só como produto de oxidação do  $\beta$ -cariofileno<sup>11</sup>.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e ao CNPq pelos auxílios e bolsas concedidos.

## REFERÊNCIAS

1. Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; *Quím. Nova* **1990**, *13*, 282.
2. Patitucci, M. L.; Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Zoghbi, M. das G. B.; Silva, J. R. de A.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 262.
3. Brochini, C. B.; *Tese de Doutorado*, IQ-USP, São Paulo, 1997.
4. Gupta, A. S.; Dev, S.; *J. Chromatogr.* **1963**, *12*, 189.
5. Gallegos Olea, R.; Roque, N. F.; *Quím. Nova* **1990**, *13*, 278.
6. Brochini, C. B.; Martins, D.; Roque, N. F.; Bolzani, V. da S.; *Phytochemistry* **1993**, *36*, 1293.
7. Connolly, J. D.; Hill, R. A.; *Dictionary of Terpenes*, Chapman and Hall, 1991.
8. Núñez, C. V.; Roque, N. F.; *Journal of Essential Oil Research*, no prelo.
9. Moreira, I. C.; Roque, N. F.; *II Congreso Mundial de Plantas Aromáticas y Medicinales para el Bienestar de la Humanidad* 1997, Mendoza, Argentina.
10. Chaves, M. H.; Roque, N. F.; *20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* (PN-024) 1997, Poços de Caldas, MG.
11. Barrero, A. F.; Molina, J.; Oltra, J. E.; Altarejos, J.; Barragan, A.; Lara, A.; Segura, M.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3813.