

IDENTIFICAÇÃO DE MONOTERPENOS POR PESQUISA NA BIBLIOTECA DE PADRÕES: ABORDAGEM ESPECTRAL INTEGRADA.

A.A. Craveiro e J.W. Alencar

Lab. Produtos Naturais – Univ. Fed. do Ceará; 60000 – Fortaleza (CE)

Recebido em 20/4/88

ABSTRACT

The use of library search computer programs based on chromatographic data (Kovat's indices) and spectral data (infrared, magnetic nuclear resonance, mass spectrometry) for monoterpenoid identification are presented and discussed.

RESUMO

Discute-se a identificação de monoterpenoides pela técnica de pesquisa numa biblioteca de padrões baseada na utilização de dados cromatográficos (índices de Kovat) e espectrométricos (infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa) integrados.

INTRODUÇÃO

A identificação automática de monoterpenos voláteis usando pesquisa numa biblioteca de padrões e dados do espectro de massa tem sido abordada em diversos trabalhos na literatura¹⁻¹⁵.

A inclusão de índices de Kovat como etapa de pré-sele-

ção para melhorar a qualidade da identificação e abreviar o tempo de consulta na biblioteca¹⁶, não representa dificuldade, uma vez que índices de Kovat e espectros de massa podem ser obtidos simultaneamente na mesma corrida cromatográfica em instrumento que acopla o cromatógrafo de gás ao espectrômetro de massa.

Por outro lado a integração de dados de espectrometria de massa com outros dados espectrais não tem sido ainda suficientemente explorada¹⁷.

Em consequência, apresenta-se neste trabalho, aplicado a monoterpenoides, um procedimento de identificação pela técnica referida abrangendo dados simplificados dos espectros mencionados.

Apesar de ilustrado para monoterpenoides o procedimento é aplicável a outras classes de substâncias dependendo apenas da especificidade da abordagem de simplificação espectral adotada.

DISCUSSÃO

Os dados usados na construção da biblioteca correspondem a informações extraídas dos espectros infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN), de carbono 13 (¹³C RMN), do espectro de massa, além de ponto de fusão (sólidos) e índices de Kovat (líquidos voláteis).

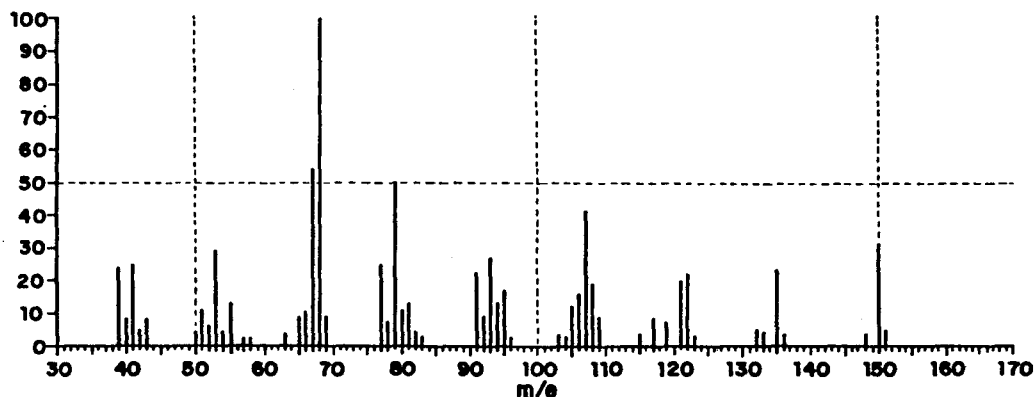


Figura 1. Divisão do espectro de massa em regiões m/z : 0-50, 51-100, 101-150, > 150. Código para o exemplo acima: 01000.

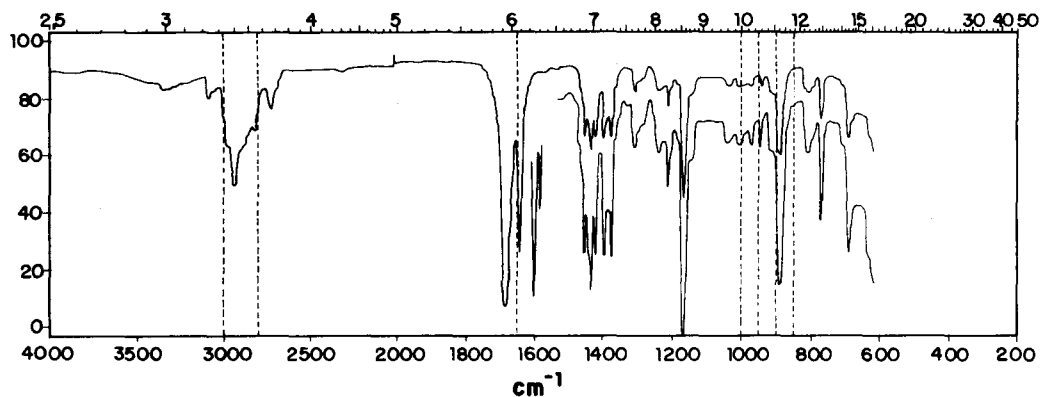


Figura 2. Divisão do espectro infravermelho nos intervalos cm^{-1} : 3000, 2800-1650, 1000-950 e 850-900. Código para o exemplo acima: 0101

O processo global consiste usar o peso molecular, o índice Kovat ou o ponto de fusão da substância a identificar como critério de pré-seleção e os dados espectrais como critérios de identificação de acordo com a regra: '1' para a presença de uma absorção válida numa dada região ou '0', caso contrário.

Para esse fim, o espectro de massa foi dividido em regiões de 50 unidades de massa/carga (m/z). Em cada região a presença de absorção igual ou superior a 50% de intensidade relativa foi codificada com '1' e caso contrário, codificada com 0, como se ilustra com o exemplo da Fig. 1.

Similarmente, o espectro ^1H RMN foi dividido nas seguintes regiões de deslocamento químico (δ): 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8 e 8, originando um número de 6 dígitos considerado de significação estrutural para monoterpenos como se ilustra com a Fig. 3.

O espectro IV foi dividido em regiões supostas de contem absorções significativas para monoterpenos incluindo os intervalos acima de 3000 cm^{-1} , $2800\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, $1000\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ e $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. As absorções relativas acima de 50%, em cada região, foram codificadas com '1' como se ilustra na Fig. 2.

Finalmente, o espectro ^{13}C RMN foi dividido em 4 regiões de deslocamento químico (δ): 50-100, 100-150, 150-200 e 200, como se ilustra com a Fig. 4.

Como resultado do processo de simplificação e codificação espectral um monoterpenoide é caracterizado por um conjunto de 4 números binários, correspondendo aos 4 espectros (IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e EM). Essa informação é complementada com o peso molecular da substância e o seu ponto de fusão (sólidos) ou índice de Kovat (líquidos voláteis).

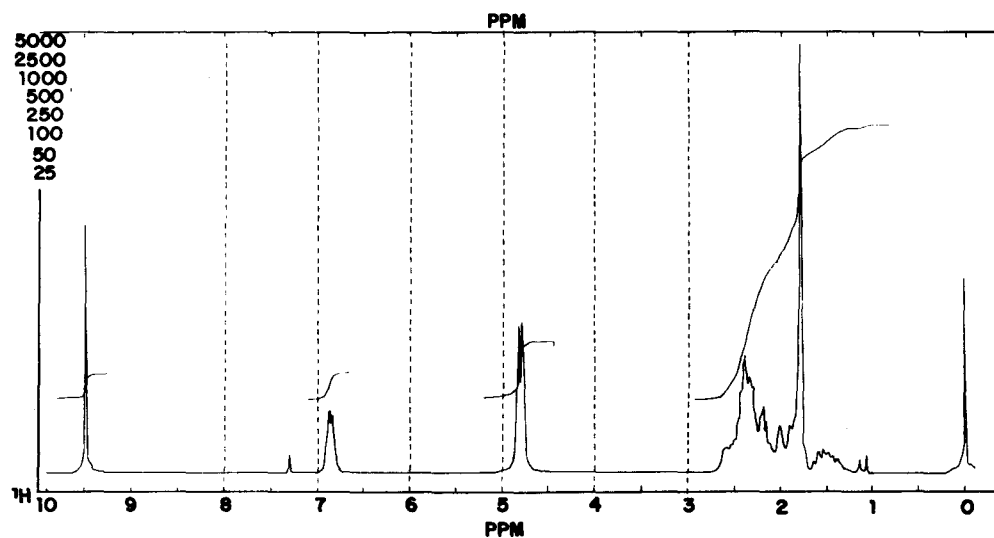


Figura 3. Divisão do espectro ^1H RMN nas regiões de deslocamento químico (δ): 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8 e 8. Código para o exemplo acima: 010101

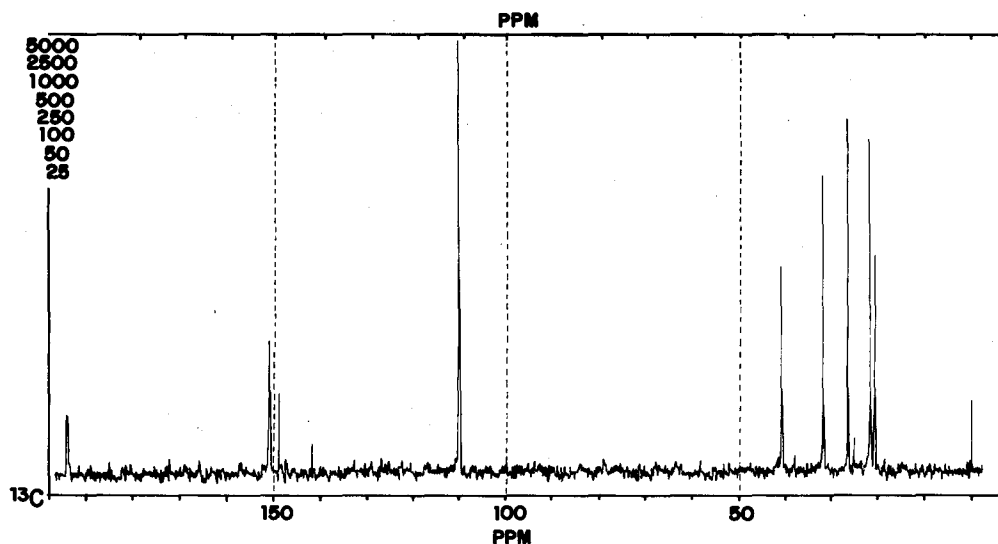


Figura 4. Divisão do espectro ^{13}C RMN nos intervalos de deslocamento químico (δ): 50-100, 100-150, 150-200 e 200. Código para o exemplo acima: 0110.

Os monoterpenoides caracterizados da maneira acima descrita foram incorporados à biblioteca de padrões para fins de identificação. Todos os dados foram arquivados em discos flexíveis para posterior uso por programas de computador.

A pesquisa propriamente dita visando a identificação de uma substância problema ("desconhecido") consiste no seguinte: os dados da substância, codificados da mesma maneira que as entradas da biblioteca são pedidos pelo programa e entrados pelo teclado como se ilustra com a Fig. 5 abaixo:

Amostra: Desconhecida

Peso Molecular:	150
Índice de Kovat:	1253
Código EM:	01000
Código IV:	0111
Código ^1H RMN	010101
Código ^{13}C RMN	0110
Grau de Semelhança GI	0.50

Figura 5. Dados do desconhecido entrados pelo teclado do computador.

Os dados do desconhecido são comparados com os dados de cada entrada existente na biblioteca. A pesquisa pode ou não ser precedida de pré-seleção baseada em índices de Kovat ou ponto de fusão, de acordo com opção ofertada pelo programa ao usuário.

Cada comparação feita recebe um valor numérico entre 0 e 1, de acordo com o grau de semelhança existente entre os dados do desconhecido e as entradas da biblioteca. O resultado global de todas as comparações é também um valor entre 0 e 1 denominado grau de identidade (GI).

A Fig. 6 mostra as entradas selecionadas pelo programa para os dados do desconhecido apresentado na Fig. 5.

ENTRADA	FÓRMULA	GI	COMPOSTOS
10	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	0.90	Perilaldeido
79	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	0.81	Carvona

Figura 6. Resposta do Programa para dados do perilaldeido (Fig. 5) simulado como desconhecido. Foram usados na pesquisa dados dos espectros IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e de massa.

A Fig. 7, mostra o resultado de pesquisas realizadas com outros monoterpenoides simulados como "desconhecidos" onde a entrada de dados pedidos pelo programa foi feita de forma incompleta. Isto é, o analista não tinha a sua disposição os 4 espectros (IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e EM) para efetivar a pesquisa. Dispunha somente dos espectros relacionados entre parêntesis, fato que contribui para baixar o GI de identificação.

COMPOSTO SIMULADO E DADOS DE ENTRADA	ENTRADA DA BIBLIOTECA	GI
Carvacrol (EM, IV, ^1H RMN)	Carvacrol	0.57
	Timol	0.57
Tagetenol (EM, IV, ^{13}C RMN)	Tagetenol	0.73
	Trimetil-vinil-citronelal	0.57
Citronelal (EM, IV, ^1H RMN)	Citronelal	0.50
	Isomentona	0.44
	Oxido de Pose (cis)	

Figura 7. Pesquisa de monoterpenoides na biblioteca de 234 padrões, com entrada incompleta de dados.

EXPERIMENTAL

Os espectros IV foram obtidos em instrumentos PERKIN ELMER mod IR 1320, na forma de filme.

Os espectros ^1H RMN e ^{13}C RMN foram obtidos em instrumentos VARIAN mod EM-360 e XL-100, usando TMS como padrão interno e CDCl_3 ou CCl_4 como solventes. Apenas os espectros ^1H RMN obtidos a 60 MHz foram incorporados a biblioteca.

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de massa Hewlett Packard mod. 5995-A equipado com coluna capilar de sílica fundida SP-2100 (30 m, d.i. = 0.25 mm) usando hélio como gás de arraste (1 ml/min), temperatura programada (50-250°, 4°/min), e impacto eletrônico (70 eV). Os espectros compilados da literatura foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV.

Os índices de Kovat foram calculados a partir de tempos de retenção de padrões internos (n-alcenos em C8, C9, C10, C11, C12, C14, C16 e C18) adicionados às amostras submetidas à cromatografia gás-líquido/espectrometria de massa.

As entradas da biblioteca, num total de 234, foram organizadas a partir de dados obtidos no laboratório e/ou compilados da literatura¹⁸⁻²⁴.

Os programas para computação foram implementados em BASIC em equipamentos Prológica, mod. CP-500 e SP-16. Uma versão dos programas em DBASE está sendo implementada²⁵.

CONCLUSÃO

A rotina de pesquisa usa 4 tipos de dados espectrais: IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e EM, codificados em cadeias de dígitos binários de comprimento de 4 a 6 dígitos. O processo de codificação é facilmente feito por programas escritos em BASIC que podem ser rodados com pequenas adaptações para qualquer microcomputador nacional de 8 ou 16 bits.

O processo de codificação dos dados espectrais, pela sua simplicidade não exige do usuário treinamento especial em elucidação espectral.

A extração da entrada da biblioteca correspondente a substância problema foi feita mesmo nos casos em que a entrada de dados foi incompleta, como já demonstrado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq e da FINEP.

REFERÊNCIAS

- ¹ Crawford, R.L.; Morrison, J.D.; *Anal. Chem.* (1968) 40, 1464.
- ² Grotch, D.L.; *Anal. Chem.* (1971) 43, 1362.
- ³ Nock, B.A.; Smith, I.C.; Wright, D.E.; Ridley, R.G.; *Anal. Chem.* (1970) 42, 1516.
- ⁴ Grotch, S.L.; *Anal. Chem.* (1973) 45, 2.
- ⁵ Finkle, B.S.; Taylor, M.D.; Borelly, E.J.; *J. Chromat. Sci.* (1972) 10, 312.
- ⁶ Merrit Jr., C.; Robertson, D.H.; Cavagnaro, J.F.; Graham, R.A.; Nicholo, T.L.; *J. Agr. Food Chem.* (1974) 22, 750.
- ⁷ Naegeli, R.P.; Clerc, J.T.; *Anal. Chem.* (1974) 46, 739.
- ⁸ Srinivas, R.S.; Borecki, D.; 'VI International Congress of Essential Oils', S. Francisco, Calif., USA (1974).
- ⁹ Drown, G.R.; *Anal. Chem.* (1975) 47, 1265.
- ¹⁰ Grotch, S.L.; *Anal. Chem.* (1975) 47, 1265.
- ¹¹ Chapman, R.; "Computers in Mass Spectrometry", Academic Press, London (1978).
- ¹² Alencar, J.W.; Craveiro, A.A. In: Mookherjee, B.D.; Musinan, C.J.; "Essential Oils", Allured Publishing Co., Wheaton, USA (1981).
- ¹³ Uethman, A.P.; Kootz, J.P.; Hindsliter-Smith, J.; Woodward, W.S.; Reilley, C.H.; *Anal. Chem.* (1982) 54, 1772.
- ¹⁴ Milne, G.W.A.; In: Beal, J.L.; Ranhards, E.; (Ed), Verlanger, (1985).
- ¹⁵ McFaden, W.H.; "Techniques of Combined Gas Mass Chromatography Mass Spectrometry", Wiley Interscience, N.York (1971).
- ¹⁶ Alencar, J.W.; Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; *J. Nat. Prod.* (1984) 47, 890.
- ¹⁷ Sasaki, S.; Abe, H.; Saits, K.; Ishda, Y.; *Bull. Chem. Soc. Japan* (1978) 51, 3218.
- ¹⁸ Helen, R.S.; Milne, G.A.W.; "EPA/NIH Mass Spectral Data Base", U.S. Government Printing Office, N.York (1974).
- ¹⁹ Stenhagen, E.; Abrahamson, S.; McLafferty, E.W.; "Registry of Mass Spectral Data", J. Wiley & Sons, N. York (1974).
- ²⁰ Ponchert, C.J. (ed.); "The Aldrich Library of Infrared Spectra", Aldrich Chemical Co. Inc., Wiscosin, USA (1975).
- ²¹ Ponchert, C.J.; Campbell, J.R.; Aldrich Chemical Co., Wiscosin, USA (1974).
- ²² Buckingham, J.; Donaghy, S.M. (ed.); "Dictionary of Organic Compounds", Chapman and Hall, N. York (1982).
- ²³ Dev. S.; Narula, A.P.S.; Yadan, J.S.; "CRC Book of Terpenoids", CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA (1982).
- ²⁴ Jennings, W.; Shiba Moto, T.; "Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Chromatography", Academic Press, N. York (1980).
- ²⁵ Os programas para Computador serão enviados mediante requisição.