

UTILIZAÇÃO DO ÍNDICE DE RETENÇÃO LINEAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM CAFÉ SOLÚVEL UTILIZANDO GC-MS E COLUNA HP-INNOWAX

Marcelo Caldeira Viegas* e Denisley Gentil Bassoli

Cia. Iguazu de Café Solúvel, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Rodovia 369, km 88, 86300-000 Cornélio Procopio-PR, Brasil

Recebido em 27/11/06; aceito em 7/5/07; publicado na web em 9/11/07

LINEAR RETENTION INDEX FOR CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN SOLUBLE COFFEE USING GC-MS AND HP-INNOWAX COLUMN. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) is widely used for the characterization of volatile compounds. However, due to the complexity of the soluble coffee matrix, a complete identification of the components should not be based on mass spectra interpretation only. The linear index of retention (LRI) is frequently used to give support to mass spectra. The aim of this work is to investigate the characterization of the volatile compounds in soluble coffee samples by GC-MS using LRI values found with a HP-INNOWAX column. The method used allows a significant increase of the reliability of identifying compounds.

Keywords: LRI; mass spectrometry; flavor.

INTRODUÇÃO

O café é caracterizado principalmente pelo impacto aromático que proporciona aos consumidores. Por isso, a composição dos voláteis responsáveis pelo perfil aromático do café tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores, onde se tem identificado mais de 850 compostos¹.

Dentre os métodos analíticos que têm sido utilizados para estudar o perfil aromático de amostras de café, pode-se citar a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) como sendo amplamente utilizada para investigação dos componentes aromáticos que apresentam maior contribuição para a característica aromática de bebidas e cafés em pó².

A técnica GC-MS juntamente com SPME em headspace dinâmico tem sido utilizada³ para a identificação e a caracterização dos compostos voláteis durante o processo de moagem de café torrado. As áreas cromatográficas de 47 picos de compostos voláteis apresentaram coeficientes de variação (CV) próximos a 5% e o perfil dos compostos voláteis em cromatografia gasosa foi similar àquele extraído por solvente, exceção aos compostos altamente voláteis, tais como 4-hidróxi-2,5-dimetil-3-(2H)-furanona e 4-etil-guaiacol.

Apesar de a técnica GC-MS ser uma poderosa ferramenta em análise qualitativa, muitas vezes as bibliotecas utilizadas poderiam não ser completas ou eficientes o suficiente para caracterizar completamente alguns compostos, sendo que o índice de retenção pode auxiliar neste propósito, evitando-se assim uma identificação equivocada.

O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse⁴.

Dentre os índices de retenção encontrados na literatura pode-se citar o índice Kováts e o índice de retenção linear (LRI) como sendo amplamente divulgados. O índice Kováts é sempre calcula-

do sob condições isotérmicas de temperatura. Quando se utilizam temperaturas programadas de coluna, um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos, sendo que este valor é chamado de índice de retenção linear – LRI⁴.

Os usuários de GC-MS tendem freqüentemente a confiar simplesmente na biblioteca de espectro de massas na identificação de compostos, mas devido à complexidade das matrizes e à ineficiência nas técnicas de extração, ao usar o LRI este processo é bastante aprimorado⁵.

Infelizmente, encontrar valores de LRI de referência pode ser um desafio. Há poucas bases de dados disponíveis na literatura e as informações são baseadas em tipos de colunas mais antigas, por exemplo, C20M e OV101 e, muitas vezes, encontrar alguns compostos de interesse pode ser um problema.

Desta maneira este trabalho apresenta uma contribuição na disponibilização de tais dados, podendo ser utilizados como futura referência para cálculo de índice de retenção linear em coluna polar HP-Innowax com temperatura programada.

Este trabalho teve por objetivo utilizar a técnica GC-MS para caracterizar os componentes voláteis responsáveis pelo impacto aromático^{1,3} de amostras de café solúvel e identificá-los com o auxílio da biblioteca de espectro NIST e valores dos índices de retenção linear (LRI) obtidos em coluna HP-Innowax.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

As amostras de café solúvel foram fornecidas pela Cia. Iguazu de Café Solúvel, e foram obtidas utilizando-se café arábica, cor de terra 45 IR e liofilizado.

Os demais padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com especificação grau GC.

Preparo das amostras

Pesou-se em balança analítica 2,80 g de café solúvel. Após a pesagem, os frascos para headspace (Agilent 20 mL) foram sela-

*e-mail: mviegas@iguacu.com.br

dos imediatamente com septos de silicone para que a composição dos compostos voláteis presentes em cada amostra permanecesse inalterada.

Metodologia headspace – SPME (HS-SPME): extração

Os frascos selados foram mantidos em banho de óleo termostático, à temperatura constante de 70 °C. Após atingido o equilíbrio de temperatura nos frascos, com a fibra retraída na agulha, o septo foi perfurado e a fibra foi exposta ao headspace da amostra. Após 30 min de extração, a fibra foi inserida diretamente no injetor do GC-MS para dessorção térmica dos compostos voláteis e transferência para a coluna cromatográfica.

Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas

As análises foram conduzidas em um sistema Agilent 6890N (Modo Scan - varredura 35 a 400 u.m.a) acoplado com detector de massas (GC-MS). Foi utilizada uma coluna capilar polar HP-Innowax (60 m x 320 µm x 0.25 µm). O injetor operou em modo splitless com temperatura constante de 250 °C. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 40 °C (5 min), 40 a 60 °C 4 °C/min (5 min), 60 a 250 °C 8 °C/min (3 min). O gás de arraste hélio (5,0 analítico) manteve o fluxo constante igual a 1,2 mL/min.

O detector de massas operou nas seguintes condições: energia de ionização: 70 eV, temperatura da interface: 280 °C, temperatura do quadrupolo: 150 °C, temperatura da fonte de íons: 230 °C. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com a biblioteca de espectros de massa NIST/2002.

Determinação do índice de retenção linear (LRI) – coluna Innowax

Uma mistura padrão de n-Alcanos (Sigma-Aldrich C₈-C₄₀) foi utilizada para verificar o desempenho do sistema GC-MS e calcular o índice de retenção linear (LRI) de cada composto na amostra. O padrão (1 µL) destes alcanos foi injetado no sistema GC-MS operando nas condições descritas acima, e seus respectivos tempos de retenção foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do LRI, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O LRI de cada componente foi calculado conforme a Equação 1

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \quad (1)$$

onde: LRI - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - n° de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os valores de índice de retenção linear calculados foram comparados com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido empregando-se a metodologia proposta.

Pode-se perceber pela Figura 1 que o cromatograma apresenta uma quantidade representativa de compostos que caracterizam o café solúvel.

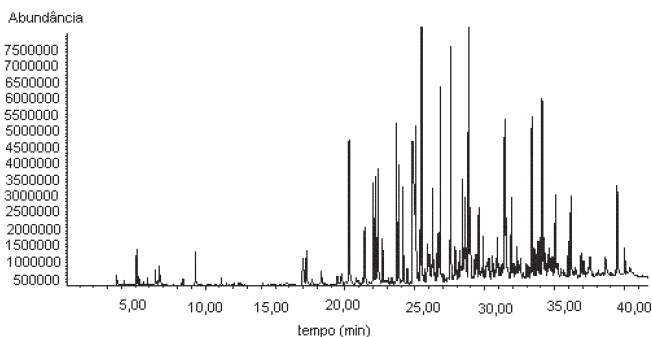


Figura 1. Cromatograma CG/MS HS-SPME - café solúvel (arábica)

Utilizando-se a técnica de GC-MS identificaram-se vários compostos citados na literatura^{3,6} como sendo componentes importantes para a qualidade aromática do café solúvel.

A Tabela 1 apresenta 88 compostos, identificados usando-se o sistema GC-MS com padrões externos, interpretação de espectros de massas (NIST) e LRI, este último com o objetivo de auxiliar no processo de caracterização. Foram estabelecidos 20 valores de LRI inéditos na literatura consultada.

Pode-se perceber pelos resultados apresentados na Tabela 1 que para a maioria dos compostos estudados os valores de LRI obtidos neste trabalho estão coerentes com os valores encontrados na literatura.

Utilizando-se a metodologia proposta, compostos importantes citados na literatura^{3,6}, tais como metional, furaneol, 2-furfuriltiol e ácido isovalérico, foram identificados neste trabalho.

Dentre os compostos identificados destacam-se alguns compostos altamente voláteis, tais como 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona, que possuem descritivos sensoriais avaliados como amanteados conforme descrito na literatura³.

A degradação de Strecker leva à formação de vários compostos relacionados⁶ como importantes na formação do aroma, tais como 2-metil-butanal e 3-metil-butanal, que são perceptíveis sensorialmente mesmo em altas diluições.

Muitas pirazinas resultantes de reações de Maillard foram identificadas neste trabalho, dentre elas pode-se citar 2,3-dimetil-pirazina, 2,6-dimetil-pirazina.

O metanotiol apresentou discrepância entre a biblioteca NIST e o LRI, sendo confirmado pelo padrão externo. Este composto, que individualmente tem aroma fortemente pútrido, é um produto da degradação térmica do metional.

Este estudo está de acordo com a literatura⁷ que descreve que mais de 80% dos compostos voláteis presentes em amostra de chá e óleos podem ser identificados com segurança com o uso de GC-MS juntamente com o índice de retenção linear.

A importância do uso dos valores de LRI acentua-se ainda mais nos compostos para os quais não se utilizou padrão externo, pois apesar de dispormos de um total de 38 padrões externos comerciais, o preço elevado em geral inviabiliza a compra de padrões para todos os compostos possíveis de serem identificados, sendo que a utilização do LRI aumenta a confiabilidade de identificação destes compostos.

CONCLUSÕES

A utilização dos valores de índice de retenção linear (LRI) aumentou a confiabilidade dos resultados obtidos em GC-MS, quando se utiliza apenas a interpretação de espectros de massas e a biblioteca NIST, o que contribuiu de forma significativa para identificação e caracterização dos compostos voláteis individuais precursores do perfil aromático de amostras de café solúvel.

Tabela 1. Compostos voláteis identificados em GC-MS e identificados pela biblioteca de espectro de massas e LRI

Composto	CAS	LRI Obtido	LRI Ref.	Método de Identificação*	Ref.
metanotiol	74-93-1	593	-	NIST + PE	-
etanal	75-07-0	702	690	NIST + LRI	29
propanal	123-38-6	763	-	NIST	-
acetona	67-64-1	788	823	NIST + LRI + PE	17
acetato de metila	79-20-9	804	834	NIST + LRI	16
2-metil-furano	534-22-5	853	817	NIST + LRI	9
butanal	123-72-8	859	867	NIST + LRI	25
acetato de etila	141-78-6	878	885	NIST + LRI	10
2-butanona	78-93-3	894	875	NIST + LRI	19
2,3-diidro-4-metil-furano	34314-83-5	901	-	NIST	-
2-metil-butanal	96-17-3	907	903	NIST + LRI	19
3-metil-butanal	590-86-3	912	906	NIST + LRI + PE	18
1-metil-piperidina	626-67-5	959	-	NIST	-
2,3-butanodiona	431-03-8	977	976	NIST + LRI + PE	23
decano	124-18-5	994	1000	NIST + LRI	9
1,2,3,6-tetraidro-1-metil-piridina	694-55-3	1030	-	NIST	-
2,3-pentanodiona	600-14-6	1056	1056	NIST + LRI + PE	19
dissulfeto de dimetila	624-92-0	1066	1081	NIST + LRI + PE	16
hexanal	66-25-1	1077	1089	NIST+ LRI	13
3-penten-2-ona	3102-33-8	1125	1121	NIST+ LRI	19
etil-benzeno	100-41-4	1125	1138	NIST+ LRI	21
2,4-dimetil-3-pentanona	565-80-0	1133	-	NIST + PE	-
3,5-dimetil-isoxazol	300-87-8	1135	-	NIST	-
4,5-dimetil-oxazol	20662-83-3	1151	1152	NIST+ LRI	27
piridina	110-86-1	1182	1181	NIST + LRI + PE	18
limoneno	5989-27-5	1195	1184	NIST+ LRI	11
pirazina	290-37-9	1214	1196	NIST + LRI + PE	18
3-hexen-2-ona	763-93-9	1218	-	NIST	-
1-etil-3-metil-benzeno	620-14-4	1220	1308	NIST+ LRI	16
2-(metoximetil)-furano	13679-46-4	1245	-	NIST	-
1-(2-metil-1-propenil)-pirrolidona	2403-57-8	1260	-	NIST	-
metil-pirazina	109-08-0	1267	1274	NIST+ LRI	13
4-metil-tiazol	693-95-8	1286	1284	NIST + LRI + PE	13
3-hidróxi-2-butanona	513-86-0	1287	1265	NIST + LRI + PE	18
2,6,11-trimetil-dodecano	31295-56-4	1299	-	NIST	-
1-hidróxi-2-propanona	116-09-6	1301	1308	NIST+ LRI	12
2,5-dimetil-pirazina	123-32-0	1328	1334	NIST + LRI + PE	13
2,6-dimetil-pirazina	108-50-9	1335	1340	NIST + LRI + PE	13
etil-pirazina	13925-00-3	1337	1339	NIST + LRI	12
2,3-dimetil-pirazina	5910-89-4	1353	1355	NIST + LRI + PE	13
2-metil-2-ciclopenten-1-ona	1120-73-6	1373	1367	NIST + LRI	20
4,5-dimetil-tiazol	3581-91-7	1379	1378	NIST + LRI + PE	13
3-etil-piridina	536-78-7	1384	1397	NIST+ LRI	12
2-etil-6-metil-pirazina	13925-03-6	1389	1388	NIST + LRI + PE	13
2-etil-5-metil-pirazina	13360-64-0	1395	1395	NIST + LRI + PE	13
2,3,5-trimetil-pirazina	14667-55-1	1409	1414	NIST + LRI + PE	13
2-etil-3-metil-pirazina	15707-23-0	1411	1407	NIST + LRI + PE	12
2-n-propil-pirazina	18138-03-9	1425	-	NIST	-
3-metil-2-buten-1-ol	556-82-1	1430	-	NIST	-
2,6-dietil-pirazina	13067-27-1	1440	1437	NIST+ LRI	12
2-furil-metanotiol	98-02-2	1444	1421	NIST + LRI + PE	13
2,5-dimetil-3-etil-pirazina	13360-65-1	1453	1439	NIST + LRI	19
ácido acético	64-19-7	1454	1459	NIST + LRI + PE	24
metional	3268-49-3	1469	1418	NIST + LRI + PE	12
furfural	98-01-1	1478	1466	NIST + LRI + PE	24
2-etil-1-hexanol	104-76-7	1494	1493	NIST + LRI	12
2,3-dietil-5-metil-pirazina	18138-04-0	1501	1494	NIST + LRI + PE	12
2-acetil-furano	1192-62-7	1516	1497	NIST + LRI	20
benzaldeído	100-52-7	1537	1518	NIST + LRI + PE	23
acetato de 2-furilmetila	623-17-6	1550	-	PE+ NIST	-

Tabela 1. continuação

Composto	CAS	LRI Obtido	LRI Ref.	Método de Identificação*	Ref.
linalol	78-70-6	1545	1566	NIST + LRI + PE	28
ácido propanóico	79-09-4	1555	1531	NIST + LRI + PE	20
5-metil-2-furanocarboxaldeído	620-02-0	1588	1570	NIST + LRI + PE	12
propanoato de 2-furilmetila	623-19-8	1606	-	NIST	-
(1-metil-etnil)-pirazina	38713-41-6	1609	1603	NIST + LRI	12
2-ciano-1,5-dimetilpirrol	56341-36-7	1612	-	NIST	-
2-acetil-piridina	1122-62-9	1618	1599	NIST + LRI + PE	13
5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopentapirazina	23747-48-0	1636	1630	NIST + LRI	13
acetil-pirazina	22047-25-2	1644	1617	NIST + LRI	13
butirolactona	96-48-0	1652	-	NIST	-
2-furil-metanol	98-00-0	1669	1667	NIST + LRI	21
ácido isovalérico	503-74-2	1680	1680	NIST + LRI + PE	26
2-(2-furimetil)-5-metil-furano	13678-51-8	1693	1663	NIST + LRI	22
3,4-dimetil-2,5-furanodiona	766-39-2	1755	-	NIST	-
2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona	80-71-7	1831	1831	NIST + LRI	20
1-(2-furilmetil)-1H-pirrol	1438-94-4	1850	-	NIST	-
guaiacol	90-05-1	1882	1859	NIST + LRI + PE	20
álcool benzílico	100-51-6	1899	1878	NIST + LRI + PE	15
2-hidróxi-3-etil-2-ciclopenten-1-ona	21835-01-8	1910	-	NIST	-
2-feniletanol	60-12-8	1931	1939	NIST + LRI + PE	28
maltol	118-71-8	1988	1968	NIST + LRI + PE	20
furaneol	3658-77-3	2042	2002	NIST + LRI + PE	26
4-etil-guaiacol	2785-89-9	2058	2032	NIST + LRI + PE	20
2-pirrolidona	616-45-5	2073	-	NIST	-
ácido nonanóico	112-05-0	2173	2177	NIST + LRI	21
4-vinil-guaiacol	7786-61-0	2217	2134	NIST + LRI + PE	11
2,4-ditert-butil-fenol	96-76-4	2315	2321	NIST + LRI	21
isoeugenol	97-54-1	2366	2250	NIST + LRI + PE	14

NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); LRI = Identificação feita através do índice de retenção linear; PE = Identificação feita através de padrões externos

Os valores de LRI apresentados neste trabalho apresentam uma importante contribuição no que diz respeito aos valores de referência deste parâmetro em colunas polares, especificamente em colunas mais recentes como a HP-Innowax.

REFERÊNCIAS

- Flament I.; Bessière-Thomas, Y.; *Coffee Flavor Chemistry*, 1st ed., Wiley: New York, 2002.
- Czerny, M.; Mayer, F.; Grosch, W.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 695.
- Akiyama M.; Murakami K.; Ohtani N.; Iwatsuki K.; Sotoyama K.; Wada A.; Tokuno K.; Iwabuchi H.; Tanaka K.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1961.
- Inczedy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M.; *Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997*, "The Orange Book", 3rd ed., Blackwell Science: Oxford, 1998.
- Mondello, L.; *III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais*, Campinas, Brasil, 2005.
- Schenker, S.; *PhD Thesis*, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2000.
- Shellie, R.; Marriott, P.; Zappia, G.; Mondello, L.; Dugo, G.; *Journal of Essential Oil Research* **2003**, *15*, 305.
- Baltes, W.; Boehmann, G.; Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 5.
- Chung, T. Y.; Eiserich, J. P.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1743.
- Jennings, W.; Shibamoto, T.; *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*, Academic Press: New York, 1980.
- Kawakami, M.; Ganguly, S. N.; Banerjee, J.; Kobayashi, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 200.
- <http://www.odour.org.uk/Iriindex.html>, acessada em Outubro 2007.
- Mottram, D. S.; *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 377.
- Nishimura, O.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2941.
- Nurgel, C.; Erten, H.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Selli, S.; *Journal of the Institute of Brewing* **2002**, *108*, 68.
- Otto, A.; Laurent, F.; Chaintreau, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 850.
- http://www.crec.ifas.ufl.edu/crec_websites/Rouseff/Website2002/Subpages/database_g_Frameset.htm, acessada em Outubro 2006.
- Shibamoto, T.; Kamiya, Y.; Mihara, S.; *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 57.
- Shimoda, M.; Shigematsu, H.; Shiratsuchi, H.; Osajima, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1616.
- Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Minegishi, Y.; Osajima, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 647.
- Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Imayoshi, K.; Noda, K.; Osajima, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 984.
- Silwar, R.; Kamperschroer, H.; Tressl, R.; *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1987**, *10*, 176.
- Sing, A. S. C.; Smadja, J.; Brevard, H.; Maigal, L.; Chaintreau, A.; Marion, J. P.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *40*, 642.
- Sumitani, H.; Suekane, S.; Nakatani, A.; Tatsuka, K.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 785.
- Umano, K.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 14.
- Wong, K. C.; Lim, C. L.; Wong, L. L.; *Flavour and Fragrance Journal* **1992**, *7*, 307.
- Yeo, H. C. H.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 370.
- Young, H.; Paterson, V. J.; *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *68*, 257.
- Yu, T-Hsi.; Chung-May, Wu; Chi-Tang, Ho; *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 800.