

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química
Departamento de Química Inorgânica e Analítica
Programa de Pós-Graduação em Química**

**ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ALECRIM
UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA (SPME), HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM
FLUÍDO SUPERCRÍTICO (SFE)**

Dissertação de Mestrado

Fabiana Gomes

Porto Alegre, julho de 2003.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Óleos Essenciais	4
2.2	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	7
2.3	Processos de extração de óleos essenciais	8
2.3.1	Destilação por arraste a vapor	8
2.3.2	Hidrodestilação	9
2.3.3	Extração com Fluido Supercrítico — SFE	10
2.4	Algumas aplicações das técnicas de hidrodestilação e SFE	12
2.5	Micro Extração em Fase Sólida - SPME	13
2.6	Algumas aplicações de SPME em óleos essenciais	14
2.7	Aspectos teóricos de SPME	15
2.8	Tratamento dos dados	18
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1	Materiais	21
3.1.1	Plantas	21
3.1.2	Reagentes	21
3.1.3	Equipamentos	21
3.2	Metodologias	22
3.2.1	Procedimento para extração por hidrodestilação	22
3.2.2	Procedimento para SFE	22
3.2.3	Análise do óleo essencial de alecrim por injeção direta em GC-ITMSD	22
3.2.4	Otimização das condições para análise por HS-SPME em GC-FID	23
3.2.5	Procedimento para análise por SPME dos óleos extraídos por hidrodestilação e SFE	24
3.3	Reprodutibilidade das medidas por HS-SPME	24
3.4	Análises das plantas <i>in vivo</i> por SPME	24
3.5	Determinação dos voláteis presentes no alecrim durante o envelhecimento das folhas após o corte	25
3.6	Estresse	25
3.7	Análise Exploratória dos Dados	26

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Escolha da planta	26
4.2	Escolha das melhores condições cromatográficas de análise	26
4.3.	Reprodutibilidade das fibras de CW-DVB e PDMS	28
4.4	Condições para análise por HS-SPME	29
4.4.1	Tempo de exposição (te)	29
4.4.2	Temperatura de exposição	35
4.5	Análise dos compostos presentes na fração volátil das folhas do alecrim	40
	<i>Ordem de saída</i>	40
4.6	Estudo comparativo dos óleos obtidos por hidrodestilação e SFE, analisados por SPME	43
4.7	Comparação entre as análises realizadas por injeção direta e por SPME dos óleos obtidos por hidrodestilação	44
4.8	Comparação entre as análises por injeção direta e SPME dos óleos obtidos por SFE	45
4.9	Envelhecimento	46
4.9.1	Avaliação do efeito de envelhecimento das folhas de alecrim, analisadas por SPME	46
4.9.2	Envelhecimento das folhas de alecrim analisadas por SPME, extraídas por hidrodestilação	49
4.9.3	Envelhecimento das folhas de alecrim analisadas por SPME, extraídas por SFE	50
4.10	Análise dos dados de envelhecimento por componentes principais	52
4.11	Perfil cromatográfico da planta <i>in vivo</i> de alecrim	58
4.12	Óleos armazenados de alecrim	59
4.13	Estresse	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rota metabólica dos metabólitos secundários derivados do isopreno.	5
Figura 2: Aparelho de destilação a vapor empregado no IB-UCS	8
Figura 3: Esquema do processo de extração por hidrodestilação utilizando <i>Clevenger</i> : (1) balão de fundo redondo; (2) manta de aquecimento e (3) condensador	9
Figura 4: Curva trifásica do CO ₂	10
Figura 5: Esquema de um extrator com fluido supercrítico	11
Figura 6: Fotografia das partes que compõem uma fibra de SPME: <i>holder</i> e fibra	13
Figura 7: (a) gráfico de <i>scores</i> e (b) gráfico de <i>loadings</i> característicos do tipo de metal encontrados em amostras de sucos de frutas	19
Figura 8: Fotografias de duas plantas de alecrim; (A) com flores e (B) sem flores	26
Figura 9: Cromatograma de GC-ITMSD do óleo de alecrim via injeção direta nas condições cromatográficas otimizadas	27
Figura 10: Gráfico bidimensional PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes tempos de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.	30
Figura 11: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loading</i> para diferentes tempos de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.	31
Figura 12: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes tempos de exposição da fibra de PDMS.	32
Figura 13: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loadings</i> para diferentes tempos de exposição da fibra PDMS.	32
Figura 14: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes tempos de exposição da fibra de CW-DVB.	33
Figura 15: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loadings</i> para diferentes tempos de exposição da fibra de CW-DVB.	33
Figura 16: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes temperaturas de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.	34
Figura 17: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loadings</i> para diferentes temperaturas de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.	35
Figura 18: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes temperaturas de exposição das fibras PDMS	36

Figura 19: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loadings</i> para diferentes temperaturas de exposição da fibra de PDMS.	36
Figura 20: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>scores</i> para diferentes temperaturas de exposição da fibra de CW-DVB.	37
Figura 21: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos <i>loadings</i> para diferentes temperaturas de exposição da fibra de CW-DVB.	37
Figura 22: Estrutura dos principais compostos presentes na fração volátil do alecrim	40
Figura 23: Cromatograma da composição volátil das folhas de alecrim com destaque para alguns compostos apresentados na Tabela V.	41
Figura 24: Cromatogramas das folhas cortadas (a), extraídas por hidrodestilação (b) e extraídas por SFE (c), analisadas por SPME no GC-ITMSD.	42
Figura 25: Cromatogramas da fração volátil do alecrim extraída por hidrodestilação e analisada por SPME (a) e por injeção direta (b).	43
Figura 26: Cromatogramas da fração volátil do óleo extraído por SFE e analisado por SPME (a) e injeção direta (b).	44
Figura 27: Cromatogramas das análises de envelhecimento por HS-SPME com folhas logo após o corte (a), 24 horas após (b) e 22 dias após o corte (c).	46
Figura 28: Cromatogramas comparativos do envelhecimento das folhas de alecrim extraídas por hidrodestilação e analisadas por SPME. (a) extração das folhas logo após o corte, (b) extração 24 horas após o corte e (c) 22 dias após o corte.	48
Figura 29: Cromatogramas obtidos a partir das análises da fração volátil do óleo de alecrim extraído por SFE logo após o corte das folhas (a), 24 horas depois (b) e 21 dias após o corte (c).	50
Figura 30: Gráfico <i>bi-plot</i> PC1 X PC2 do cruzamento dos dados de envelhecimento das folhas cortadas (FC) com os dados de hidrodestilação (H), analisadas por CW-DVB.	52
Figura 31: Gráfico <i>bi-plot</i> PC1 X PC3 da associação dos dados de envelhecimento das folhas cortadas (FC) com os dados de hidrodestilação (H) analisadas por CW-DVB.	53
Figura 32: Gráfico <i>bi-plot</i> PC1 X PC2 da associação dos dados da planta <i>in vivo</i> (PN) com o envelhecimento das folhas cortadas (FC) e os extratos obtidos por hidrodestilação (H), analisados por PDMS.	53
Figura 33: Gráfico <i>bi-plot</i> PC1 X PC3 da associação dos dados da planta <i>in vivo</i> com o envelhecimento das folhas cortadas (FC) e os extratos obtidos por hidrodestilação (H), analisados por PDMS.	54

Figura 34: Cromatogramas comparativos da planta analisada <i>in vivo</i> (a) e após o corte de suas folhas (b) por GC-ITMSD.	55
Figura 35: Gráfico <i>bi-plot</i> , PC1 X PC2 do cruzamento dos dados dos óleos hidrodestilados analisados por SPME (HS) e por injeção direta (HD), com os dados dos óleos extraídos por SFE e analisados por SPME (SS) e injeção direta (SD), com as folhas analisadas por SPME (FS).	56
Figura 36: Cromatogramas comparativos da planta analisada <i>in vivo</i> (a) e após o corte de suas folhas (b) por GC-ITMSD.	57
Figura 37: Comportamento dos monoterpenos não-oxigenados nos óleos armazenados de alecrim.	58
Figura 38: Comportamento do α -pineno, limoneno e 1,8-cineol nos óleos armazenados de alecrim.	59
Figura 39: comportamento dos monoterpenos oxigenados nos óleos armazenados de alecrim.	60
Figura 40: Comportamento dos sesquiterpenos nos óleos armazenados de alecrim.	61
Figura 41: Cromatograma da planta <i>in vivo</i> analisada por PDMS em situação normal.	61
Figura 42: Cromatograma da planta <i>in vivo</i> analisada por PDMS após oito dias sem água.	62
Figura 43: Cromatograma da planta <i>in vivo</i> de alecrim, analisada por CW-DVB, em situação normal de cultivo.	62
Figura 44: Cromatograma da planta <i>in vivo</i> de alecrim, analisada pela fibra CW-DVB, após oito dias sem água.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Parâmetros avaliados para determinar as melhores condições de análise	23
Tabela II: Parâmetros cromatográficos definidos para GC-IT-MSD e GC-FID	27
Tabela III: Dados de área média (A_m) e desvio-padrão relativo (%RSD) para os padrões de monoterpenos analisados por CW-DVB, PDMS e injeção direta	28
Tabela IV: Tempo de equilíbrio ($T_{e,q}$) de padrões de monoterpenos utilizando as fibras de CW-DVB e PDMS	29
Tabela V: Compostos tentativamente identificados com a biblioteca NIST e com padrões, presentes nas folhas de alecrim logo após o corte por HS-SPME	38
Tabela VI: Terpenos presentes nas folhas cortadas de alecrim, durante o período de envelhecimento, monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 24, 96 e 264 horas após	47
Tabela VII: Terpenos presentes nos óleos de alecrim, obtidos por hidrodestilação durante o período de envelhecimento, monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 96h, 192h, e 264h após o corte	49
Tabela VIII: Terpenos presentes nos extratos de alecrim, obtidos por SFE durante o período de envelhecimento, e monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 144 após, 216 horas e 336h após	51

1 INTRODUÇÃO

Na história da humanidade, as plantas aromáticas vêm sendo utilizadas desde a Antigüidade. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através da descoberta do processo de destilação, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos. Com isso, na China, na Índia e no Oriente Médio, as plantas aromáticas, os óleos e as águas perfumadas passaram a ser amplamente utilizados, da cozinha às práticas religiosas⁽¹⁾.

No contexto atual, óleos com uma melhor relação custo-benefício requerem dos métodos de extração de óleos essenciais a preservação da composição original da planta que produz a fragrância natural, buscando o máximo rendimento.

Dentre as técnicas usuais de extração estão a extração com solventes orgânicos, a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação e a extração com fluido supercrítico. A técnica de destilação por arraste a vapor é a mais empregada no setor industrial de óleos essenciais, tendo como característica a extração dos componentes voláteis, presentes no vegetal, pelo vapor d'água gerado. A técnica de hidrodestilação é uma técnica laboratorial que consiste no contato direto da água quente com o material a ser extraído. As extrações com solventes orgânicos têm como desvantagem o fato dos extratos apresentarem resíduos de solvente, exigindo, assim, uma etapa de remoção, resultando em custos operacionais adicionais. Além disso, pode haver perdas dos compostos mais voláteis. A extração com fluido supercrítico permite, entre outras vantagens, a extração de compostos termosensíveis por utilizar temperatura de extração amena.

O rendimento e a composição de um óleo essencial dependem tanto de fatores intrínsecos (hereditariedade) quanto extrínsecos (chuva, seca)^{2,3}. O tipo de processo de extração é um fator extrínseco importante capaz de alterar consideravelmente o perfil da essência. Técnicas mais eficientes na extração de cânfora, por exemplo, são mais aplicadas na indústria farmacêutica por produzir um extrato com maior ações analgésicas. Já os extratos com altos teores de monoterpenos não oxigenados são inviáveis às indústrias de perfumaria.

O Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB-UCS), desde 1992 coordena um projeto intitulado "Extração e Transformação de Óleos Essenciais", que tem como objetivo agregar agroindústrias, agricultores e pesquisadores para o desenvolvimento da produção de óleos essenciais a partir de plantas aromáticas. Dentro desta idéia, o cultivo de

alecrim tem despontado como alternativa para os diferentes setores industriais a que se pode destinar, surgindo como nova opção econômica na produção agrícola.

O alecrim e o seu óleo apresentam odor agradável e características terapêuticas, requisitos para os setores de perfumaria, aromaterapia e fitoterapia. Nos últimos anos, o governo do Estado tem demonstrado interesse na área de oleoquímica, que aparece como alternativa de produção devido à sua ampla e diversificada aplicação.

Nesse universo produtivo, o controle de qualidade tanto da planta como do óleo essencial, e os fatores que influenciam na qualidade do produto final têm desempenhado papel importante na definição de um produto com alto valor agregado que possa atender às exigências do mercado.

As técnicas de caracterização de óleos essenciais abrangem análises organolépticas – como odor e cor –, testes físico-químicos –, como umidade, densidade, índice de refração e metais pesados –, técnicas cromatográficas – como, por exemplo, a cromatografia a gás com detector seletivo de massas – e técnicas de eletroforese⁴. Esses processos são empregados para a determinação da qualidade do óleo após a extração. Da década de 90 em diante, com a introdução da técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME – do inglês, *Solid Phase Micro Extraction*), passou a ser possível realizar análises de plantas *in vivo*, permitindo obter um perfil dos compostos voláteis próximo do original, contribuição valiosa para o setor de óleos essenciais.

O tratamento de um grande número de dados tem exigido o uso de ferramentas matemáticas que permitam interpretações mais consistentes. O método de análise dos componentes principais PCA (do inglês, *Principal Components Analysis*) tem sido apontado na literatura como uma ferramenta que permite identificar correlações significativas a partir de combinações lineares de variáveis independentes, gerando um novo sistema com variações significativas.

A partir dessas considerações, este trabalho teve como objetivo geral, investigar a composição volátil dos óleos de alecrim, cultivados em Campestre da Serra (RS), extraídos por hidrodestilação, extração com fluido supercrítico (SFE) e microextração em fase sólida (SPME). Como parte desse trabalho foi necessário inicialmente desenvolver uma metodologia analítica para a amostragem e a identificação dos constituintes da fração volátil das amostras. Parâmetros tais como: natureza da fibra, tempo e temperatura de exposição, foram estudados

na otimização do método. O trabalho envolveu ainda a planta de alecrim em estado anormal de desenvolvimento, como ausência de água, situação real que preocupa os cultivadores. Em todas as análises foram aplicadas as metodologias analíticas otimizadas para cromatografia a gás com detector de ionização em chama (GC-FID; do inglês, Gas Chromatography with Flame Ionization Detector) e cromatografia a gás com detector seletivo de massas (GC-MSD; do inglês, *Gas Chromatography with Mass Selective Detector*). No tratamento dos resultados foi avaliada a potencialidade da ferramenta matemática de Análise por Componentes Principais (PCA). Cabe salientar que esse trabalho de pesquisa foi realizado em parceria com o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB-UCS) e com a Pontifícia Universidade Católica do RS (PUC-RS).

O presente manuscrito aborda inicialmente um capítulo de revisão bibliográfica onde, entre outros itens, serão relatados os trabalhos publicados sobre a aquisição de óleos essenciais obtidos pelas mesmas técnicas aplicadas nesta investigação. No capítulo seguinte, onde trata do procedimento experimental, estão dispostas as metodologias otimizadas e, finalmente, a discussão dos resultados obtidos com as plantas e óleos de alecrim.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos Essenciais

Desde a Antigüidade, os homens utilizavam compostos extraídos de plantas com o objetivo de curar doenças e até mesmo como aromatizantes e flavorizantes em especiarias culinárias. Essas misturas aromáticas complexas de substâncias voláteis ficaram conhecidas como *óleos essenciais*.

Segundo a definição de Baroni et al.¹, os óleos essenciais, são uma parte do metabolismo da planta, constituídos geralmente por terpenos que podem ou não estar associados a outros compostos, na maioria voláteis, e que caracterizam o aroma e a fragrância do vegetal. Os óleos essenciais encontram-se em diversas partes das plantas, principalmente nas folhas e flores, mais especificamente em estruturas especializadas, como os pêlos glandulares e as bolsas secretoras^{5,6}.

Dentre os terpenos, os mais encontrados são os monoterpenos, compostos de dez carbonos, e os sesquiterpenos, compostos de 15 carbonos. Esses compostos são originados por processos conhecidos como rotas metabólicas. Aquelas que são essenciais à vida do vegetal, como as rotas metabólicas de síntese, degradação e conservação de energia, pertencem ao metabolismo primário da planta. Quanto às rotas secundárias, acredita-se que são ativadas durante algumas situações específicas de crescimento e desenvolvimento ou, ainda, em situações de estresse, provocadas por ataques microbiológicos ou por limitações nutricionais³. Especula-se ainda que tais metabólitos surgem como defesa a agentes externos, agindo como repelentes ou atratores dos mesmos⁷. Na Figura 1 tem-se a rota metabólica dos metabólitos secundários derivados do isopreno.

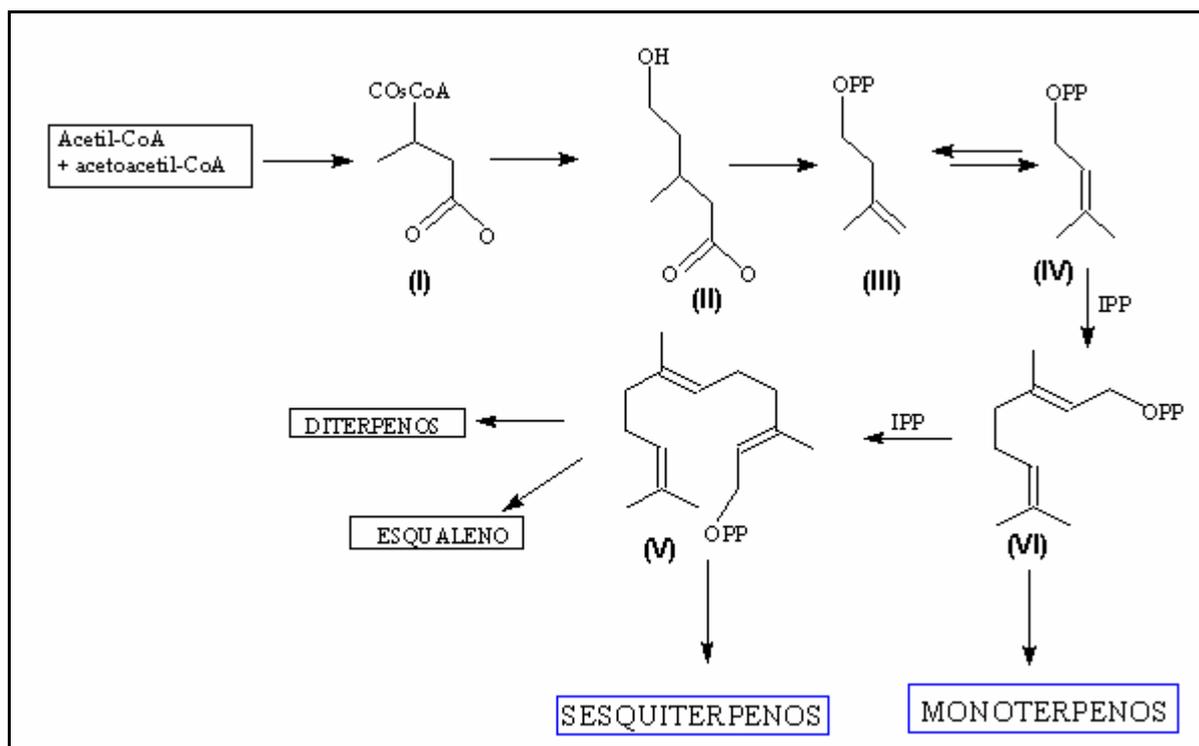


Figura 1: Rota metabólica dos metabólitos secundários derivados do isopreno. (I) 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA; (II) mevalonato; (III) isopentenil-pirofosfato (IPP); (IV) dimetilalil-pirofosfato; (V) geranyl-pirofosfato e (VI) farnesil-pirofosfato³.

Uma unidade de acetoacetil-CoA se condensa com uma molécula da acetil-CoA e, após hidrólise, forma a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (I). Por uma reação irreversível, (I) é reduzida a mevalonato (II), então convertido em isopentenil-pirofosfato (III), ou isopreno ativo, a unidade básica da formação dos terpenos. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isômero, dimetilalil-pirofosfato (IV), formam *trans*-geranyl-pirofosfato (V), originando os demais terpenos. Novas ligações entre *trans*-geranyl-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultam em sesquiterpenos e diterpenos. Entretanto, a ligação entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (VI) originará squaleno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides.

Dependendo da localização do óleo na planta, os óleos essenciais apresentam diferentes composições. O Eucalipto, a menta, o patchuli e a sálvia armazenam suas essências nas folhas; já a angélica, o gengibre, o sândalo e a valeriana armazenam nas raízes; as frutas como a laranja, o limão e os cítricos em geral, no pericápio do fruto, e a lavanda, a rosa e o tomilho, nas flores. O rendimento varia de 0,5 a 2,0%, dependendo do processo extrativo. Em vista disso, a produção e extração de óleos essenciais de plantas aromáticas têm se desenvolvido cada vez mais com o propósito de abastecer um mercado ocioso. Até 1960 era muito difícil a entrada de novas essências, principalmente nas

indústrias de alimentos, por causa do grande impacto que as essências sintéticas causaram. Com a exigência cada vez maior do uso de compostos naturais, outras parcerias em busca de tecnologias e cultivos mais avançados foram surgindo. Dessa forma, o mercado internacional de novas essências vem tendendo a desenvolver-se cada vez mais.

Em 1994, o mercado mundial de plantas aromáticas foi estimado em 50 mil toneladas por ano, do qual somente a Europa importou 13 mil toneladas. Entre os mais destacados estavam sálvia, orégano, hortelã, alecrim, entre outros. O valor estimado do mercado de óleos essenciais e produtos relacionados, em âmbito mundial, girou em torno dos 5 milhões de dólares em 1995. Aproximadamente 65% desse volume proveio de espécies cultivadas, cerca de 30%, de árvores, e 1%, de espécies silvestres¹.

As principais consumidoras desses óleos essenciais são as indústrias de sabores e fragrâncias. Na Europa, as líderes do mercado de sabores são as fabricantes de bebidas não-alcoólicas e dietéticas. No setor de perfumes, a França, a Alemanha e a Inglaterra detêm 57% do mercado europeu, o qual movimentou aproximadamente 67 mil toneladas em 1998.

O Brasil situa-se como um dos principais produtores de óleos essenciais no mercado mundial. Entre as essências mais produzidas estão pinheiro-bravo, laranja, hortelã, eucalipto, citronela, alecrim e erva-limão. Em alguns cultivos, como pau-rosa e carqueja, o País detém quase que a total exclusividade da produção. Também exporta consideráveis quantidades de plantas medicinais, extratos e substâncias isoladas, alcançando valores da ordem de 22 bilhões de dólares por ano, estimando, ainda que esses valores tendam a aumentar 0,2 % ao ano. Tais dados vêm estimulando o setor agroindustrial do País.

Dentro do Rio Grande do Sul, o cultivo de plantas aromáticas tem despontado como alternativa para os diferentes setores industriais a que pode se destinar, surgindo como nova opção econômica na produção agrícola. O Pólo Agroindustrial de Caxias do Sul apresenta uma área cultivada na ordem de 5 ha, com um produção anual do óleo de alecrim de aproximadamente 60 Kg/ha e 600 Kg/ano, com dois cortes anuais. A maioria dessa produção abastece a indústria alimentícia, enquanto a outra parcela se divide entre a farmacêutica e a fitoterápica. Nos últimos anos, o governo do Estado tem demonstrado interesse na área de oleoquímica como alternativa de produção devido a sua ampla e diversificada aplicação.

2.2 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim, da espécie *Rosmarinus officinalis* L., é uma planta aromática pertencente à família das *Labiadaes*, originária da Europa e adaptável a solos secos, pobres e bem drenados. Com relação ao clima, adapta-se melhor ao subtropical⁸.

O nome *Rosmarinus* vem do latim e significa "orvalho que vem do mar". Isso por causa das flores azuladas, pertencentes à planta, que inundam as praias do Mediterrâneo, lembrando o orvalho. Na literatura consta que a planta de alecrim era considerada símbolo de fidelidade entre namorados e era muito usada na Idade Média para purificar os quartos de doentes. Pela reputação de estimular a memória, conta-se que estudantes gregos usavam ramos de alecrim nos cabelos, principalmente quando submetidos a exames⁹.

A primeira extração do óleo de alecrim por destilação foi realizada no ano de 1330 por Ramón Llull¹⁰. A partir de então, o óleo foi muito usado na perfumaria, estando presente também na denominada "água húngara"¹¹. O óleo de alecrim começou a ser estudado principalmente por suas propriedades: diuréticas, antimicrobianas, cicatrizantes, tônicas, cardiotônicas, anti-reumática, estimulantes, digestivas, anti-reumáticas, e até mesmo inseticidas^{12,13}. Os responsáveis por essas ações estão também presentes na composição da fração volátil do óleo essencial de alecrim. Os compostos mais encontrados são os monoterpenos não-oxigenados, como α -pineno, β -pineno, canfeno, mirceno e limoneno; os monoterpenos oxigenados, como 1,8-cineol, cânfora, linalol, verbinol e terpineol; e os sesquiterpenos, como α - e β -cariofilenos e α -humuleno.

Para classificar indivíduos de uma mesma espécie que apresentam diferentes composições químicas, as plantas são separadas por quimiotipos (QTs). O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) possui 3 quimiotipos principais: o QT1, normalmente vindo da Espanha e que possui alto teor de cânfora¹⁴; o QT2, produzido na França, Inglaterra e Índia, com maior teor em cineol (eucaliptol); e o QT3, produzido somente na França e que possui predominância de verbenona. Dellacassa et al¹⁵ estudaram o alecrim cultivado no Brasil, Uruguai e Argentina e observaram semelhanças na composição dos três óleos. O alecrim cultivado no Brasil, entretanto, apresentou uma proporção maior de verbenona e alcoóis (linalol, borneol, α -terpineol e geraniol) quando comparado aos cultivados no Uruguai e Argentina. O quimiotipo apresentado por uma espécie pode determinar a aplicação da planta. O alecrim de quimiotipo QT3, por exemplo, é indicado para problemas hepáticos e de vesícula, devido à presença de verbenona². Os demais quimiotipos não apresentam nenhum benefício para os problemas hepáticos.

Entretanto, a composição química de uma essência se define fundamentalmente pelo método de obtenção utilizado para isolá-la da planta. Ou seja, o processo de extração pode tornar-se seletivo para determinados compostos, o que difere a aplicação desse óleo.

2.3 Processos de extração de óleos essenciais

A identificação e caracterização de compostos voláteis provenientes de uma variedade de espécies de plantas aromáticas têm interessado muitos pesquisadores, fornecendo resultados bem satisfatórios. No entanto, para se chegar próximo ao perfil natural da amostra, é preciso determinar a melhor técnica de extração dos seus compostos.

Dos processos existentes para extração de óleos essenciais, a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação e a SFE foram as técnicas enfocadas nesta revisão, sendo as duas últimas as mais utilizadas no processo experimental deste estudo, selecionadas pela quantidade de planta disponível para o trabalho.

2.3.1 Destilação por arraste a vapor

No processo de destilação por arraste a vapor, a amostra geralmente é fresca e cortada em pedaços pequenos. O material é colocado em vasos extratores (ver Figura 2), onde é submetido a uma corrente de vapor d'água. Na indústria, os vasos utilizados são cilíndricos e de aço inoxidável. Os vapores passam pelo condensador, onde ocorre a condensação da água e do óleo essencial. Finalmente os dois líquidos separam-se no decantador – ou vaso florentino, como é chamado.

Essa técnica é muito usada para essências líquidas, especialmente as utilizadas na perfumaria. Industrialmente, esse método é viável, pois apresenta bons rendimentos (0,5 a 4%)¹⁶ e produtos com grande pureza. A desvantagem da técnica é que, durante a destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações³.



Figura 2 Aparelho de destilação a vapor empregado no IB-UCS, (1), vaso extrator; (2), condensador e (3), vaso florentino.

2.3.2 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um dos processos mais antigos para obtenção de óleos essenciais. Esse processo utiliza, para destilação de plantas em laboratório, um aparato conhecido como *clevenger* (ver Figura 3)¹⁷. Nesse sistema, o material é colocado no interior de um balão de fundo redondo (1) com água suficiente para encobri-lo, onde é mantido em manta de aquecimento (2) e acoplado ao *clevenger*. Com o aquecimento, a água evapora, arrastando os compostos voláteis presentes na planta. Em seguida, no condensador (3) do próprio aparelho, ela se condensa na forma de óleo. Dependendo do tipo de planta a ser extraída, a hidrodestilação pode proporcionar um rendimento de 1 a 2% de óleo essencial¹⁸.

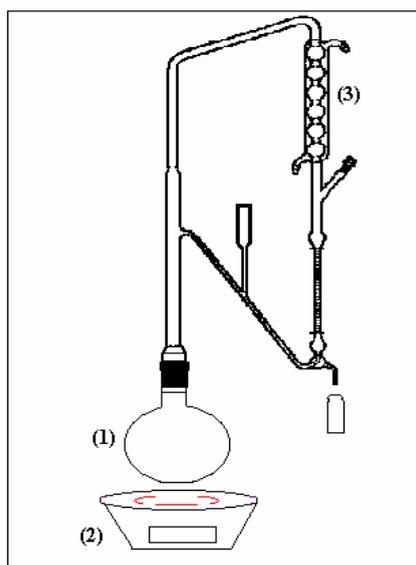


Figura 3: Esquema do processo de extração por hidrodestilação utilizando *Clevenger*. (1) balão de fundo redondo; (2) manta de aquecimento e (3) condensador.

2.3.3 Extração com Fluido Supercrítico — SFE

Atualmente, a extração com fluido supercrítico é um dos métodos muito utilizado na extração de óleos essenciais¹⁹⁻²². Nesse processo, o solvente extrator está no estado supercrítico. Isso significa que tanto a pressão quanto a temperatura estão acima dos valores críticos (ver Figura 4). A temperatura mais alta que um gás pode ser convertido em líquido por aumento de pressão é conhecida como temperatura crítica (T_c). Pressão crítica (P_c) é a pressão mais alta em que um líquido é convertido a gás por aumento de temperatura²³. O fluido supercrítico possui propriedades únicas, intermediárias entre gases e líquidos, que dependem da pressão, temperatura e composição do fluido. Apresentam menor viscosidade que os líquidos e maior coeficiente de difusão, permitindo uma maior

eficiência nas extrações. Além disso, a densidade pode ser ajustada variando a pressão e a temperatura, proporcionando, assim, uma maior seletividade²⁴.

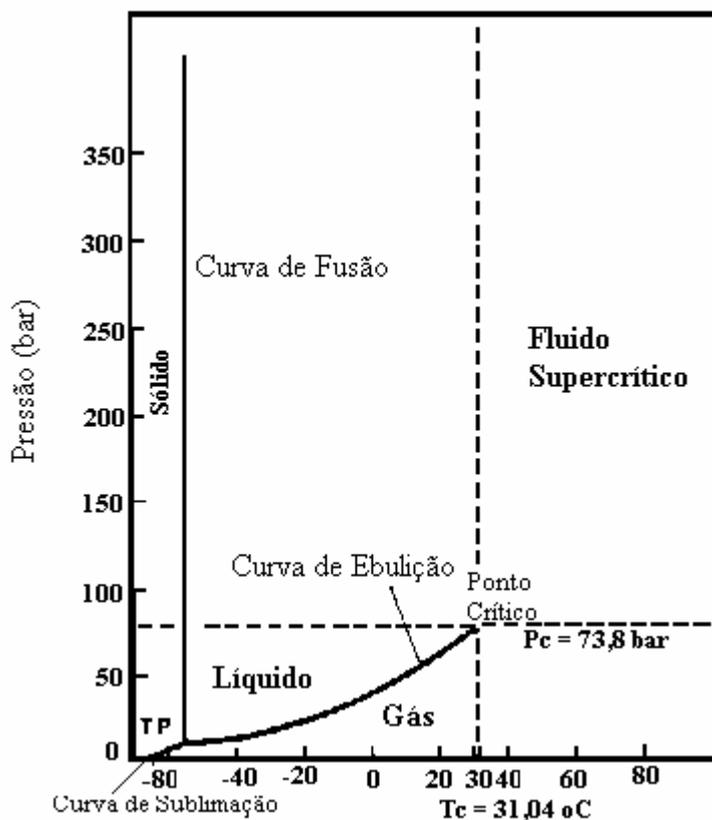


Figura 4: Curva trifásica do CO₂.

Um sistema básico de SFE opera com um reservatório de CO₂, um trocador de calor para refrigeração do CO₂ (P1), uma bomba de alta pressão, um permutador de calor para aquecer o solvente até a temperatura de extração (P2), uma célula de extração e um restritor (ver Figura 5). O solvente extrator, após atingir as condições supercríticas, passa pela célula de extração onde contém a amostra e a mistura resultante vai ao restritor. Nele, o fluido é despressurizado e os analitos extraídos são separados. Para o caso de unidade analítica, os extratos são adsorvidos em cartuchos contendo fases sólidas adsorventes. O solvente extrator é eliminado por decompressão progressiva até alcançar a temperatura e a pressão ambiente²⁴. A pureza e o perfil da essência obtida vão depender das condições de extração. Para aumentar a seletividade e/ou a solubilidade do processo, pode-se adicionar ao CO₂ um solvente orgânico, conhecido como modificador químico ou co-solvente, tais como hexano e metanol²⁵. A etapa de mistura pode ser feita em cilindros pré-misturadores ou diretamente na célula de extração.

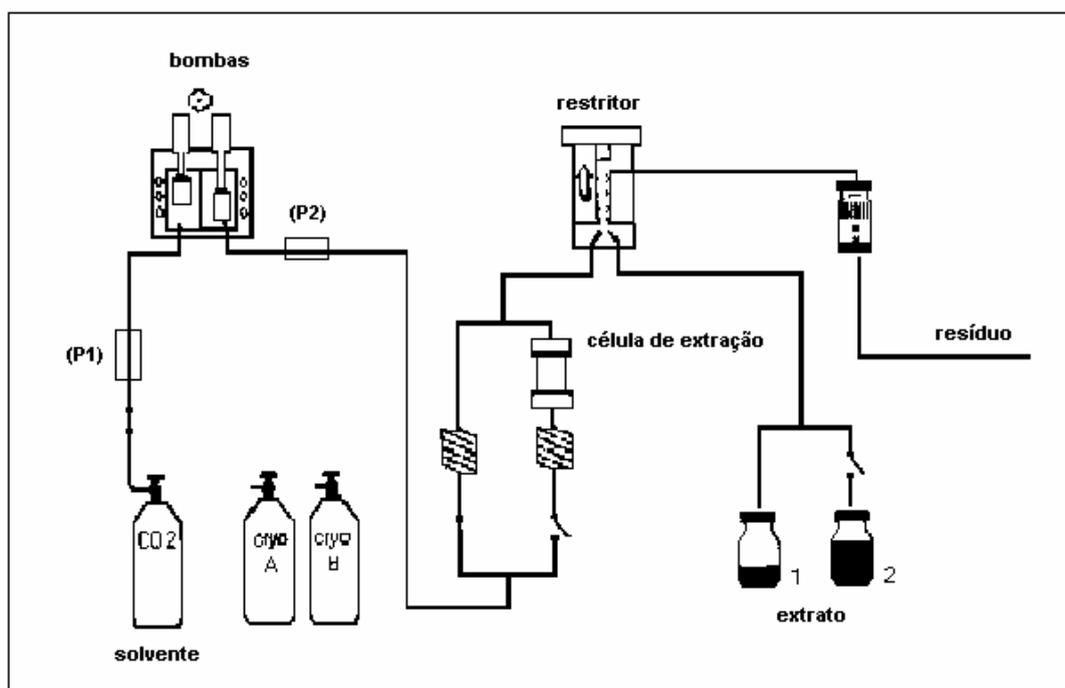


Figura 5: Esquema de um extrator com fluido supercrítico²⁶.

Para a escolha do solvente adequado, deve-se levar em consideração a polaridade dos compostos a serem extraídos. O CO₂ puro extrai com muita eficiência compostos apolares e de baixa polaridade. Já para extrair compostos polares, faz-se necessário adicionar metanol, por exemplo, como modificador. Alguns cuidados importantes devem ser considerados quanto ao uso dessas substâncias, uma vez que podem provocar mudanças nos valores de pressão e temperatura críticas. Outra vantagem no uso de CO₂ é o fato de ele não necessitar de altas temperaturas e pressão para atingir o seu ponto crítico, além, é claro, de ele ser um solvente atóxico, uma vez que o processo libera o fluido ao meio ambiente após despressurização²⁷.

A SFE apresenta algumas vantagens, tais como alto rendimento, fácil eliminação do solvente e utilização de baixas temperaturas para a extração, o que evita, principalmente, a degradação dos componentes lábeis presentes no óleo essencial.

2.4 Algumas aplicações das técnicas de hidrodestilação e SFE

As técnicas de hidrodestilação e SFE são muito citadas na literatura, principalmente na extração de plantas aromáticas. Em alguns exemplos de extrações com plantas, citam-se segurelha (*Satureja hortensis* L.), hortelã (*Mentha x piperita* L.), dragoeiro (*Dracocephalum*

moldavica L.)²⁸, lavanda (*Lavandula angustifolia* L.)^{21,22}, eulalípto (*Eucaliyptus citriodora* L.)²⁹, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)^{30,31}, entre outras. Os estudos realizados comprovaram que a composição dos extratos obtidos pelos dois processos apresentavam diferenças. Tais diferenças dependem não somente do tipo de planta, mas também das condições de extração. A SFE permite ajustar, além da pressão e temperatura do sistema, o tipo de solvente extrator e a adição de modificadores de polaridade. A hidrodestilação possibilita a variação apenas do tempo de extração. A maioria das publicações em SFE descrevem extrações com CO₂, já que apresentam menor custo e relativa pureza, embora extrações com água no estado subcrítico tenham sido eficientes na extração de compostos terpênicos³².

Desvantagens da SFE em relação à hidrodestilação ou destilação com arraste a vapor podem surgir com a extração de compostos indesejáveis presentes nas amostras. Reverchon et al.²¹, ao extrair óleo essencial das flores de lavanda, verificou que extraía, juntamente com os terpenos, compostos parafínicos (C₂₆, C₂₇, entre outros). Ao diminuir a temperatura do sistema (inferior a 20°C), a solubilidade desses compostos diminuem no CO₂, permitindo uma melhor separação. Carlson et al.³³ encontraram, nos extratos de SFE do capim-limão, terpenos mais pesados (di- e triterpenos), ao utilizarem densidades maiores para o CO₂.

2.5 Micro Extração em Fase Sólida - SPME

A Microextração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase MicroExtraction* – SPME) é uma técnica de extração/análise que permite ser usada diretamente à amostra, sem a necessidade de pré-concentrá-la³⁴. Ela adapta-se perfeitamente à cromatografia, tanto a gás quanto à líquida³⁵.

A análise de compostos voláteis e semivoláteis normalmente é realizada por cromatografia a gás, principalmente quando trata-se de extratos naturais⁴. Entretanto, os métodos tradicionais usados para extrair compostos voláteis de não-voláteis são muito demorados e podem acarretar em perdas e degradação de alguns compostos. Buscando minimizar tais problemas, utilizam-se muitas vezes amostragens em *headspace*, seja este estático ou dinâmico (o último também conhecido como *purge-and-trap*)³⁶. Contudo, esses métodos tradicionais não eliminam a etapa de pré-concentração exigida para análises em nível de traços, consumindo tempo e também solventes. Na SPME, muitas das dificuldades das outras técnicas inexistem. Não requer, por exemplo, o uso de solventes ou sistemas complicados de amostragem e pode ser usada para analisar voláteis e semivoláteis nas

fases líquida, gasosa e sólida. Além disso, possui o diferencial de se poder realizar análises não-destrutivas.

O dispositivo manual de SPME é essencialmente uma seringa modificada contendo um êmbolo que permite a exposição e a retração da fibra, respectivamente durante as etapas de exposição e dessorção. A Figura 6 apresenta a fotografia de uma fibra de SPME. A fibra contém sílica fundida, revestida com um filme polimérico de diferentes espessuras. Para a extração, a amostra é colocada dentro de um frasco apropriado, vedado com *septos* de teflon, onde será violado pela fibra. Os voláteis presentes no material irão se difundir pelo *headspace* até serem absorvidos pelo filme. Após esse processo, a fibra é recolhida e injetada diretamente no injetor do GC, que com o aumento da temperatura irá dessorver os compostos para dentro da coluna.



Figura 6: Fotografia das partes que compõem uma fibra de SPME: *holder* e fibra³⁷.

A escolha do tipo de revestimento é baseada no peso molecular do analito e em sua polaridade^{38,39}. Baixos pesos moleculares ou analitos muito voláteis são requisitos para uma fibra apolar, como *polidimetilsiloxano* (PDMS), enquanto que para moléculas muito polares a mais adequada seria uma fibra de *poliacrilato* (PA).

Logo, a técnica de SPME pode abranger uma diversidade de amostras. Com a característica de não ser destrutiva, ela torna-se uma ferramenta muito útil, principalmente para a análise de espécies vivas⁴⁰, plantas⁴¹ e animais⁴², com resultados bem interessantes. Na literatura, alguns trabalhos envolvendo plantas, realizados em laboratório e *in situ*,

demonstraram a necessidade de uma sistemática de transporte e de amostragem em campo da fibra que impeçam perdas dos compostos voláteis do momento da coleta até o momento da análise cromatográfica.

2.6 Algumas aplicações de SPME em óleos essenciais

Desde que a técnica de SPME surgiu como ferramenta analítica, a sua aplicabilidade tem sido ilimitada. Na área de óleos essenciais encontram-se diversos trabalhos publicados, mas em número reduzido e destinado ainda à amostragem da planta *in vivo*⁴³.

A SPME se encaixa perfeitamente no estudo dos terpenos presentes na fração volátil das plantas por serem compostos voláteis com grandes coeficientes de difusão⁴⁴. A afinidade desses compostos, porém, depende consideravelmente do tipo de material que reveste a fibra de SPME. Steffen e Pawlyszin utilizaram dois tipos de revestimento para extrair os compostos voláteis responsáveis pelo odor do suco de laranja, uma de polidimetilsiloxano (PDMS) e outra de poliacrilato (PA). Conforme anteriormente mencionado, a primeira fibra tem característica apolar, e a segunda, polar. Os autores constataram que os terpenos α -pineno, β -mirceno, γ -terpineno e limoneno, todos apolares ou de baixa polaridade, foram melhores extraídos com a fibra de PDMS, enquanto que a extração de terpenos como linalol e α -terpineol foi mais efetiva com a fibra de PA⁴⁵.

Existem também no mercado uma mistura de fases, tais como *carbowax* e *polidimetilsiloxano* (CW-PDMS), *carboxen* e *polidimetilsiloxano* (CAR-PDMS), *carbowax* e *divinilbenzeno* (CW-DVB), entre outras. Normalmente as fibras contendo uma mistura de fases permitem uma maior eficiência na extração com resultados bem mais rápidos. Esse fato foi comprovado através de uma pesquisa com as frutas cupuaçu, graviola, cajá e umbu, típicas do norte e nordeste do Brasil. Neste trabalho⁴⁶ foram utilizadas, além das fibras de PDMS e PA, duas fibras mistas, *carbowax-divinilbenzeno* (CW-DVB) e *carboxen-polidimetilsiloxano* (CAR-PDMS). A fibra CAR-PDMS mostrou-se a mais eficiente na extração dos voláteis de todas as frutas estudadas.

Tratando-se de amostras de plantas, sabe-se que a análise de folhas intactas e de folhas danificadas apresentam composição diferenciada na fração volátil. Vereen et al.⁴⁷ analisou por SPME folhas de Abeto fraser (*Abies fraseri*) intactas e mecanicamente danificadas⁴⁷. Os experimentos mostraram que os monoterpenos α -felandreno e γ -terpineno estavam presentes apenas na fração volátil das folhas danificadas.

Publicações envolvendo a técnica de SPME aplicada à análise de alecrim se limitam apenas ao óleo extraído. Não se tem conhecimento da existência na literatura, até o

presente momento, de pesquisas relacionadas à análise da planta de alecrim *in vivo*, e a técnica de SPME.

2.7 Aspectos teóricos de SPME

O princípio da técnica de SPME é o mesmo para qualquer método de extração envolvendo a partição dos analitos entre duas fases em equilíbrio. A situação mais comum envolve a extração dos analitos de um meio aquoso para uma fase polimérica que reveste a fina fibra de sílica fundida.

Há três tipos de extração em SPME: por membrana, direta e *headspace*. Na amostragem por membrana, a fibra é inserida em uma membrana imersa na amostra; trata-se do processo menos utilizado em SPME. Na amostragem direta, a fibra é inserida diretamente na amostra e os analitos são sorvidos diretamente sobre o revestimento da fibra. No modo *headspace*, os analitos precisam ser transportados através da barreira de ar antes de alcançarem a fibra. Comparada ao modo direto, essa amostragem protege mais a fibra de analitos de alto peso molecular e interferentes não-voláteis, uma vez que a SPME não necessita de prévio tratamento da amostra³⁴. Além disso, os tempos necessários para alcançar o equilíbrio (t_e) no modo *headspace* são menores do que aqueles em modo direto em condições semelhantes de análise⁴⁸. Como os analitos voláteis e semi-voláteis se concentram mais no *headspace*, o transporte de massa será mais rápido, possibilitando extrações em menores tempos.

Todavia, a cinética do processo de extração por SPME pode ser afetada pela temperatura e pela agitação da amostra. Segundo Pawliszyn⁴⁹, uma fase aquosa bem agitada permite um transporte de massa na fase aquosa muito mais rápido que nas outras fases envolvidas. A descrição da cinética de SPME pode ser encontrada na literatura^{50,51}.

A quantidade de analito sorvido pela fibra depende da razão de distribuição de massa, D , descrita pela equação abaixo⁵²:

$$D = K_d \frac{V_2}{V_1} \quad (1)$$

V_1 e V_2 são os volumes da amostra e do revestimento da fibra, respectivamente, e K_d o coeficiente de distribuição. Neste caso, considera-se que o analito é uma espécie química isolada e simples.

Assim, a fração do analito extraído é dada por:

$$f_{ex} = \frac{D}{D+1} = \frac{K_d V_2}{K_d V_2 + V_1} \quad (2)$$

Na SPME, a razão entre V_2 e V_1 é muito pequena. Portanto, f_{ex} irá depender de K_d e dos volumes V_2 e V_1 das duas fases.

Para empregar análises quantitativas, que são baseadas em frações constantes de analitos extraídos da amostra, a massa da substância (n) deve ser igual ao produto da sua concentração inicial (C_0) com a fração extraída (f_{ex}). Conforme a equação 3.

$$n = C_0 \cdot f_{ex} \quad (3)$$

Na amostragem por *headspace*, tem-se o equilíbrio entre três fases: amostra-ar; ar-revestimento e amostra-revestimento, de acordo com as equações seguintes.

Equilíbrio amostra-ar:

$$K_1 = D_1 \frac{V_1}{V_2} \quad (4)$$

Neste caso, D_1 é o coeficiente de difusão do analito na amostra, V_1 é o volume da amostra e V_2 é o volume do *headspace*.

Equilíbrio ar-revestimento:

$$K_2 = D_2 \frac{V_2}{V_3} \quad (5)$$

Onde D_2 é o coeficiente de difusão do analito no *headspace* e V_3 é o volume do revestimento.

Assim, o equilíbrio amostra-revestimento será:

$$K_1 K_2 = D_1 \cdot D_2 \frac{V_1}{V_3} = D_3 \frac{V_1}{V_3} \quad (6)$$

A fração total do analito extraído pela fibra (f_{ex}) será dada por:

$$f_{ex} = \frac{D_3}{D_3 + 1} = \frac{K_1 K_2 V_3}{K_1 K_2 V_3 + V_1} \quad (7)$$

As expressões descritas acima consideram, de uma forma geral, as extrações por SPME, não diferenciando o tipo de revestimento. Quando o revestimento for um polímero líquido, como PDMS, o mecanismo físico-químico de extração será por partição ou absorção. Revestimentos sólidos ou mistos, como CW-DVB, apresentam mecanismo por adsorção. O princípio de extração é o mesmo para ambos: inicialmente há a interação das moléculas dos analitos à superfície do revestimento. Nessa etapa, o coeficiente de difusão é o fator limitante. A migração dos analitos ao seio do revestimento ou sua permanência na superfície do mesmo dependerá da grandeza do coeficiente de difusão. Moléculas orgânicas em PDMS apresentam coeficientes de difusão próximas àquelas em solventes orgânicos (valores entre 10^3 - 10^4), o que possibilita uma difusão ao longo do revestimento do PDMS relativamente rápida. Por outro lado, no revestimento sólido, os coeficientes de difusão de moléculas orgânicas são tão pequenos que considera-se que todas as moléculas permanecem na superfície do revestimento. Todavia, como o revestimento sólido é formado por poros, analitos remanescentes podem provocar um fenômeno conhecido como *carryover*, no qual mesmo após sucessivas dessorções ainda possam conter analitos encapsulados no interior dos poros³⁹. Um dos meios de contornar esse problema é deixar a fibra dessorvida no injetor do cromatógrafo por um tempo maior.

2.8 Tratamento dos dados

De posse de um grande número de resultados e variáveis e com o objetivo de extrair informações que fossem realmente relevantes, buscou-se um tratamento que interpretasse os dados de uma forma objetiva. A análise multivariada apresenta essa característica⁵³.

A análise multivariada envolve duas matrizes, uma matriz **X**, de variáveis independentes, associada a uma matriz **Y**, de variáveis dependentes. A relação matemática estabelecida entre **X** e **Y** constitui a modelagem do sistema.

Contudo, antes de se iniciar a modelagem, faz-se necessária uma análise exploratória dos dados. Um dos métodos muito usados para isso é a análise por componentes principais (PCA). Esse método manipula a matriz de dados para representar as diferenças presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores. A partir daí obtém-se um novo conjunto de eixos denominados de componentes principais (PCs) para representar as amostras em um sistema de poucas dimensões. As novas

coordenadas da amostra, nesse novo conjunto de eixos das PCs, são denominadas de *scores*. Cada PC é construída a partir da combinação linear das variáveis originais, o que gera coeficientes relativos ao peso com que cada variável contribui. Esses coeficientes são denominados de *loadings*⁵⁴⁻⁵⁶.

Como exemplo, tem-se a determinação dos teores de minerais (Ca, P, Na, K, Mg, Zn, Fe, Mn e Cu) em amostras de sucos de frutas realizadas por espectrometria de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)⁵⁷.

Os espectrogramas, um para cada amostra, são organizados numa matriz X ($n \times m$), de variáveis independentes,

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{2n} & \dots & x_{nm} \end{pmatrix}$$

onde cada linha da matriz representa uma amostra e contém as absorvâncias registradas para cada comprimento de onda. Portanto, $x_{11}, x_{21}, \dots, x_{n1}$ são as respostas na enésima frequência para as amostras 1, 2, ..., n . O outro conjunto de dados (Y) é constituído das variáveis dependentes, que, nesse caso, são os metais. Em contextos de uma única variável, os dados são caracterizados pelo vetor y .

A Figura 7 mostra o gráfico bidimensional do conjunto de amostras do exemplo citado acima. Nesse caso, a matriz de dados consiste de 42 linhas (amostras de sucos em replicatas) e 9 colunas (variáveis) que foram pré-processadas por auto-escalamento antes de serem calculados os *scores* e *loadings* representando os teores de metais. O processo de auto-escalamento centra os dados na média e divide-os pelo respectivo desvio-padrão, sendo um para cada análise, de forma que todas as variáveis passam a ter a mesma importância.

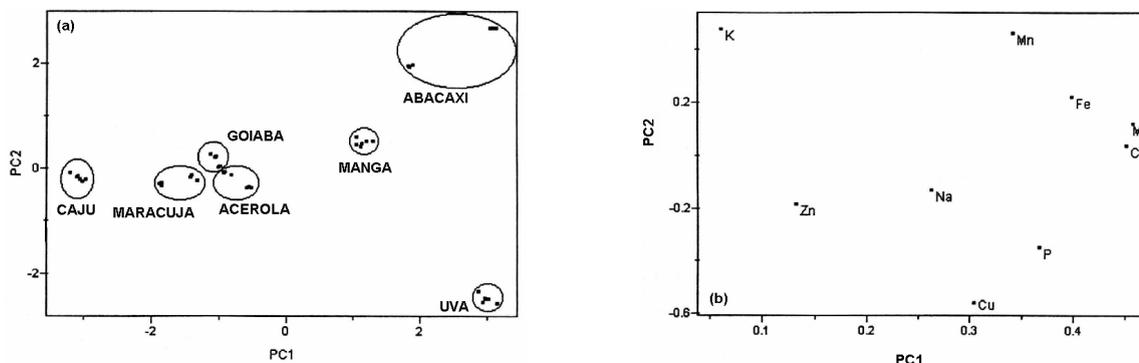


Figura 7: (a) gráfico de *scores* e (b) gráfico de *loadings* característicos do tipo de metal encontrados em amostras de sucos de frutas.

A função das componentes principais (PCs) é descrever a variação ou o espalhamento entre os pontos do gráfico usando o menor número possível de eixos. Isso é feito definindo novos eixos, componentes principais, que apresentem alinhamento com os dados. No gráfico da Figura 7, observa-se que a primeira componente principal (PC1) explica 49,6% da variância total dos dados, e a segunda componente principal (PC2), 19,6%. As duas juntas, descrevendo mais que 60% da variância total do sistema. Nele, nota-se que diferentes sucos foram agrupados entre si, segundo as diferenças nos teores de metais. Os sucos de acerola e goiaba, por manterem-se próximos nas três componentes principais, indicam que seus teores de minerais diferenciam-se menos.

Pelo gráfico de *scores* observa-se que há separação entre os sucos de caju, maracujá, goiaba, acerola e manga na PC1. E a PC2 separa os sucos de abacaxi e uva dos demais. No gráfico de *loadings* verifica-se que a PC1 relaciona-se principalmente aos metais Fe, P, Mg e Ca, enquanto a PC2 relaciona-se aos metais Mn, Cu, P e K.

Na PC1 os sucos de caju possuem menores valores de *scores*, indicando menores teores dos metais Ca, Mg e Fe, por serem os metais que mais se destacam nessa componente principal. Os sucos de abacaxi apresentam valores de *scores* mais positivos nas PC1 e PC2, por conterem maior teor de Mn, Fe, Mg e Ca.

Estatisticamente, a PCA busca um padrão válido de variâncias e de co-variâncias entre variáveis e amostras. Esse padrão é obtido pela extração dos valores e vetores próprios de uma matriz quadrada construída pela multiplicação da matriz original dos dados pela sua transposta.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{L}^T$$

A matriz \mathbf{X} contém n linhas e m colunas, correspondendo ao número de amostras e variáveis independentes, respectivamente. A matriz \mathbf{T} , conhecida como matriz *score*, contém n linhas e g colunas; e a matriz \mathbf{L} , conhecida como matriz *loading*, contém m linhas e g colunas, onde sua transposta possui g linhas e m colunas. Se \mathbf{X} é auto-escalada ou centrada na média, e o número de amostras é menor que o número de variáveis independentes, g é reduzido a 1.

A PCA tem sido aplicada a diferentes estudos e muitas vezes associada a outro método de análise exploratória^{58,59}. A análise hierárquica de agrupamentos (HCA), por exemplo, complementa a análise de componentes principais, permitindo a construção de um dendograma. Nele é possível visualizar facilmente os grupos correlacionados de amostras, ou variáveis, em um espaço bidimensional.

O uso de PCA e HCA é demonstrado em um estudo feito com amostras de águas marinhas, onde se desejou verificar se a composição das amostras variavam com a estação do ano⁶⁰. A PCA mostrou que a concentração de certos compostos são mais efetivos no verão do que no inverno, e a HCA mostrou uma forte correlação entre alguns compostos.

A etapa da modelagem depende da seleção de um conjunto de amostras cuidadosamente escolhidas para que sejam representativas de toda a região a ser modelada. Outros exemplos de modelagem incluem o PLS, PCR, KNN, SIMCA⁶¹, MDPREF⁶² e outros.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1 Plantas

As amostras de alecrim, *Rosmarinus officinalis* L., foram cultivadas na região de Campestre da Serra, RS, onde está localizada a estação de cultivo racionalizado do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB-UCS). As coletas foram realizadas por um profissional agrônomo do próprio IB-UCS e transplantadas em vasos cerâmicos para as posteriores análises. As plantas, com idade aproximada de 18 meses, não apresentavam flores no momento das coletas.

3.1.2 Reagentes

Padrões: (1S)-(-)- α -pineno (Merck), mirceno, 2careno, (R)-(+)-limoneno (Aldrich, 97%), α -terpineno (Aldrich), linalol (Aldrich, 97%), cânfora (Synth), (S)-(-)-verbenona (Aldrich, 99%) e geraniol (Aldrich).

Solvente: hexano (grau pesticida, Ominisolv);

Gás de arraste: Hélio (grau 5.0, White-Martins);

Gás para SFE: CO₂ (grau 5.0, White-Martins);

Fibras de SPME: *polidimetilsiloxano* (PDMS) com 100 μ m de espessura e *Carbowax-divinilbenzeno* (CW-DVB) com 65 μ m de espessura.

3.1.3 Equipamentos

Cromatógrafo a gás com detector seletivo de massas com sistema *ion trap* (GC-ITMSD: Varian 3800-Saturno 2000) com espectroteca interna NIST, equipado com coluna HP-5MS (30 m x 0,25 μ m);

Cromatógrafo a gás (Agilent, Série 6890) com detector seletivo de massas com sistema quadrupolo (GC-MSD: Agilent MS 5973 *Network*) equipado com coluna CP-Sil 8 CB (30 m X 0,25 μ m);

Cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC-FID: Shimadzu 17-A) equipado com coluna DB-5 (30 m x 0,25 μ m);

Extrator com Fluido Supercrítico (SFE HP 7680T);

Suporte de SPME: *holder* comercial (cat. n° 5-7330, SUPELCO);

Aparelho *Clevenger* para hidrodestilação.

3.2 Metodologias

3.2.1 Procedimento para extração por hidrodestilação

As extrações por hidrodestilação foram realizadas em *Clevenger* acoplado a um balão de fundo redondo de 1 L e manta de aquecimento. Ao balão foram adicionados 20 g de folhas cortadas e 400 mL de água. O tempo de extração foi de 1 hora, e os extratos dos óleos (cerca de 0,2 mL) foram diluídos a 1 mL em hexano e secos em Na_2SO_4 , antes de serem preparadas as soluções. Os óleos foram conservados em geladeira dentro de frascos âmbar. Observou-se diferença de coloração dos óleos com o decorrer do tempo, onde nos primeiros dias o óleo apresentava uma coloração amarela escura e, nos últimos dias, uma coloração mais clara. As condições operacionais da hidrodestilação foram otimizadas no IB-UCS.

3.2.2 Procedimento para SFE

A SFE foi realizada no laboratório de óleos essenciais do IB-UCS. Cerca de 2 g de folhas cortadas foram colocadas na célula de extração do equipamento, onde foi feita a extração com solvente CO_2 , em estado supercrítico, por um período de 30 minutos. Para atingir o estado supercrítico, aplicou-se uma pressão de 90 bar e temperatura de 60°C. Tais condições foram previamente otimizadas pelo IB-UCS para o alecrim, objetivando uma maior extração de monoterpenos oxigenados.

O óleo obtido no processo foi recolhido em hexano e seco com Na_2SO_4 anidro, para posterior análise. Os óleos foram conservados em geladeira.

3.2.3 Análise do óleo essencial de alecrim por injeção direta em GC-ITMSD

A fim de determinar as melhores condições para análise do óleo essencial, foi utilizada amostra de óleo extraído por destilação por arraste a vapor fornecida pelo IB-UCS. Cerca de 1 μL do óleo puro ($m = 0,026$ g, considerando a densidade do óleo de alecrim $0,87$ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) foi diluído em 1 mL de hexano, e deste, 1 μL foi injetada em GC-ITMSD. Na Tabela I estão listados os parâmetros otimizados para as análises de óleo, tanto por injeção direta quanto por HS-SPME. As temperaturas do injetor e da interface mantiveram-se constantes em 250°C e 270°C, respectivamente.

Tabela I: Parâmetros avaliados para determinar as melhores condições de análise.

	Parâmetros	Condições
	Temperatura inicial (°C)	35 - 65
Programação da coluna	Rampa 1 de aquecimento (°C.min ⁻¹)	2 - 15
	Rampa 2 de aquecimento (°C.min ⁻¹)	2 - 30
Fluxo do gás de arraste (mL.min ⁻¹)		0,7 - 1,0
Volume de óleo (µL)		0,5 - 100

A fim de verificar se há variação na composição do óleo essencial armazenado, foram analisadas oito amostras de óleos de alecrim fornecidos pelo IB-UCS, armazenados em períodos que variaram de cinco meses a seis anos. A partir desses óleos foram preparadas soluções diluídas em hexano, na concentração de 800 µg.L⁻¹. As soluções de cada óleo foram analisadas por cromatografia a gás com detector seletivo de massas, utilizando as condições apresentadas na Tabela I.

3.2.4 Otimização das condições para análise por HS-SPME em GC-FID

Inicialmente foi preparada uma solução em hexano dos padrões listados na Tabela I, nas concentrações de: α -pineno (4,4 mg.L⁻¹), mirceno (9,9 mg.L⁻¹), 2-careno (8,4 mg.L⁻¹), α -terpineno (9,4 mg.L⁻¹), limoneno (4,2 mg.L⁻¹), cânfora (3,1 mg.L⁻¹), linalol (4,3 mg.L⁻¹), verbenona (4,9 mg.L⁻¹) e geraniol (8,8 mg.L⁻¹). Um volume de 10 µL dessa solução foi adicionada a frascos âmbar, próprio para análises de SPME, contendo 10 mL de água milli-Q.

As fibras de PDMS e CW-DVB foram individualmente expostas ao *headspace* da solução para avaliar o tempo de exposição de 5 a 60 minutos. O tempo de dessorção foi mantido invariável em 60 minutos, tempo total da separação cromatográfica.

Uma vez determinado o melhor tempo de exposição para cada fibra, as soluções-padrão foram submetidas ao aquecimento em três diferentes temperaturas entre 25 e 50°C. O aquecimento foi realizado em banho-maria com controle de temperatura.

Todas as análises por HS-SPME foram realizadas de modo estático.

3.2.5 Procedimento para análise por SPME dos óleos extraídos por hidrodestilação e SFE

Uma solução de hexano foi preparada com os óleos obtidos por hidrodestilação e SFE na concentração de 890 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Um volume de 10 μL dessa solução foi colocada em frascos de SPME com 10 mL de água milli-Q. As fibras de PDMS e CW-PDMS foram expostas à solução no tempo otimizado na seção 3.2.4 e injetadas no GC-FID.

3.3 Reprodutibilidade das medidas por HS-SPME

Soluções de concentrações conhecidas, contendo os compostos citados no item 3.1.2, foram analisadas em quintuplicata. Cerca de 10 μL da solução-padrão preparada no item 3.2.2 foram transferidas para cinco frascos contendo 10 mL de água milli-Q. As fibras (PDMS e CW-DVB) foram expostas no tempo de exposição escolhido como o mais adequado, e as amostras foram analisadas por GC-FID. As análises foram realizadas todas no mesmo dia com temperatura ambiente controlada em 21°C. A partir dos dados de área obtidos, foi determinado o desvio-padrão relativo (%RSD) para cada composto avaliando sua área relativa. Os cálculos foram realizados seguindo as equações apresentadas abaixo.

$$\text{Área relativa} = \frac{\text{área do composto}}{\text{área total}} \quad \%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Onde SD representa o desvio-padrão e X , o valor médio de área.

3.4 Análises das plantas *in vivo* por SPME

As análises da planta *in vivo* de alecrim foram realizadas através do enclausuramento de um dos galhos da planta em um frasco de SPME. A fibra foi acomodada dentro do frasco de modo que nenhuma folha tocasse o seu revestimento. O pequeno volume do frasco (40 mL) permitiu uma maior concentração dos componentes voláteis e semi voláteis da planta, permitindo a detecção de todos os analitos de interesse em um tempo menor de exposição.

Foram testados tempos de exposição de 15 a 180 minutos para verificar o tempo de equilíbrio de alguns compostos presentes na composição volátil do alecrim com a fibra de CW-DVB. As condições cromatográficas utilizadas foram as determinadas no item 3.1.2 para o GC-FID. As duas fibras foram expostas à planta utilizando frascos diferentes para permitir condições iguais de análise.

3.5 Determinação dos voláteis presentes no alecrim durante o envelhecimento das folhas após o corte

Os compostos voláteis presentes nas folhas de alecrim foram monitorados diariamente após o corte das folhas por HS-SPME. As folhas foram cortadas em três partes, e secas à temperatura ambiente dentro da capela (desligada). Cerca de 0,15 g do material cortado foi colocado no frasco de SPME para posterior análise. Esse procedimento foi primeiramente realizado durante um período de 22 dias para o sistema de detecção no GC-ITMSD, e em um segundo momento durante um período de 15 dias, para o sistema GC-FID.

As folhas, após serem analisadas por SPME, foram submetidas à extração por hidrodestilação e por SFE, conforme procedimentos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4. As amostras de óleo obtidas em cada etapa foram analisadas por injeção direta e por HS-SPME.

3.6 Estresse

Duas plantas de alecrim foram submetidas à ausência de água por oito dias. As análises foram realizadas por HS-SPME e GC-ITMS e GC-FID, respectivamente, seguindo o procedimento descrito para análise *in vivo* da seção 3.4. A planta, após ter sido transplantada para um vaso, foi irrigada diariamente e monitorada por HS-SPME até ser obtido um perfil cromatográfico constante. Após três dias, a planta foi sujeitada à ausência de água por oito dias, sendo analisada por HS-SPME (com as duas fibras) e GC-FID a partir do quinto dia. As condições cromatográficas foram as otimizadas na seção 3.1.2.

3.7 Análise Exploratória dos Dados

A análise multivariada aplicada neste trabalho foi realizada no programa computacional *Unscrambler*, da empresa Camo ASA. Os dados passaram pelo processo de auto-escalamento para obtenção dos valores de *scores* e *loadings*.

As análises de interesse foram: variações existentes entre os processos de extração aplicados neste trabalho (hidrodestilação e SFE) e analisados por injeção direta e SPME; variações entre as folhas cortadas e a planta *in vivo*; variações provocadas com a mudança de temperatura na etapa de extração por SPME; diferenças significativas entre as duas fibras estudadas (CW-DVB); relevância no tempo de exposição e variações entre o sistema utilizando GC-ITMSD e GC-FID.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha da planta

A planta de alecrim foi escolhida, frente às outras espécies cultivadas pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, por apresentar um valor comercial de grande interesse para os produtores locais de ervas secas e óleo essencial. As amostras de alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L), da família das *Labiadaes*, utilizadas neste trabalho, apresentaram idades aproximadas de 18 meses, sem floração (fase estéril). A Figura 8 mostra uma planta de alecrim em dois momentos, com flores (A) e sem flores (B).



Figura 8: fotografias de duas plantas de alecrim; (A) com flores e (B) sem flores.

4.2 Escolha das melhores condições cromatográficas de análise

As melhores condições cromatográficas para análise das amostras em estudo, após vários experimentos, são dadas na Tabela II.

Tabela II: Parâmetros cromatográficos definidos para GC-IT-MSD e GC-FID.

Parâmetros	GC-IT-MSD/GC-MSD	GC-FID
Programa de Temperatura	35(1) 3°C.min ⁻¹ – 60(15) 2°C.min ⁻¹ – 120(0) 5°C.min ⁻¹ – 270(2)	60(10) 2°C.min ⁻¹ – 120(0) 5°C.min ⁻¹ – 270(0)
Temperatura do Injetor	250°C	250°C
Temperatura do Detector	-	270°C
Temperatura da Interface	270°C/290°C	-
Fluxo do gás de arraste	1 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹
Faixa de varredura m/z	60-650	-
Energia de impacto	70 eV	-
Corrente do filamento	50 µA	-
Coluna	HP-5MS/CP-Sil8 CB	DB-5

A Figura 9 apresenta um cromatograma do óleo de alecrim, extraído por destilação com arraste a vapor, e analisado nas condições cromatográficas apresentadas na Tabela II, por GC-ITMSD. Nas condições estabelecidas, a separação dos compostos foi satisfatória, com exceção aos monoterpenos 1,8-cineol e limoneno, que coeluem no tempo aproximado de 19 min. De acordo com a literatura, a fase estacionária mais adequada para a separação desses dois compostos é a SE-52⁴.

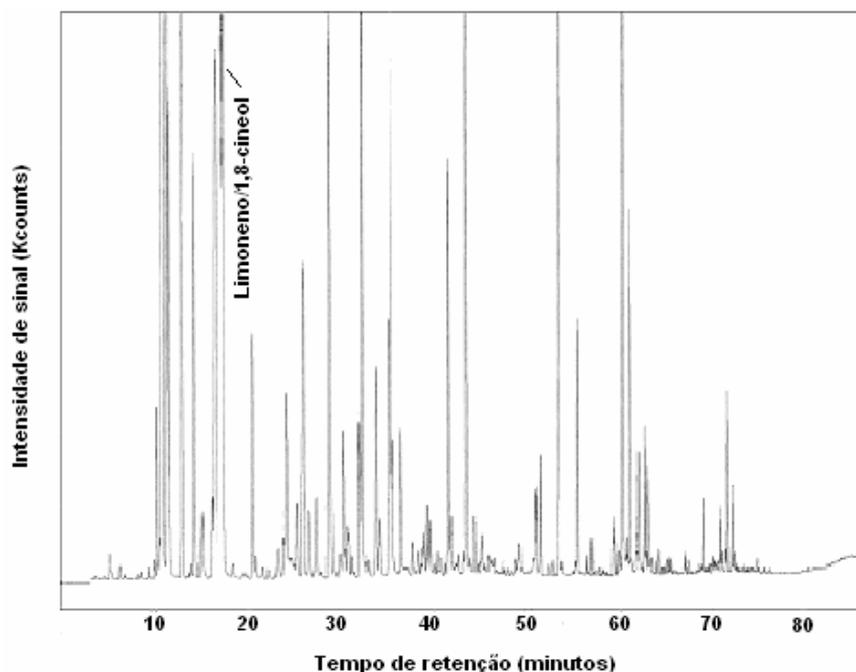


Figura 9: Cromatograma de GC-ITMSD do óleo de alecrim via injeção direta nas condições cromatográficas otimizadas.

As condições cromatográficas foram copiladas da literatura e adaptadas às condições da amostra^{14,15}. Por tratar-se de compostos voláteis de baixo peso molecular, optou-se por uma temperatura inicial da coluna de 35°C para evitar perdas destes compostos. Uma vez identificados os terpenos de interesse, essa programação inicial foi aumentada para 60°C quando analisada via GC-FID, com um tempo de separação menor de 60 min. As temperaturas de injetor não foram superiores a 250°C para não danificar as fases das fibras de SPME, uma vez que o revestimento de CW-DVB suporta no máximo temperatura de 260°C e o revestimento de PDMS, 280°C.

4.3. Reprodutibilidade das fibras de CW-DVB e PDMS

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade das medidas de área com as fibras dos terpenos presentes na solução padrão, determinados por SPME e por injeção direta, foram realizadas análises em quintuplicata conforme o item 3.3. A Tabela III apresenta os valores obtidos.

Tabela III: Área média (Am) e desvio padrão relativo (%RSD) para os padrões de monoterpenos analisados por CW-DVB, PDMS e injeção direta.

Composto	Am_{CW-DVB}	% RSD	Am_{PDMS}	% RSD	Am_{dir}	%RSD
a-pineno	3317	11,97	21666	16,39	11176	2,54
mirceno	23791	8,17	56754	16,19	17672	2,45
2-careno	15661	13,59	60218	15,95	18896	2,42
a-terpineno	25780	9,14	63630	16,17	18935	2,70
limoneno	16314	8,83	38990	15,97	11345	2,41
cânfora	32845	5,54	47467	16,44	23157	2,93
linalol	782	14,10	612	16,17	13449	2,64
verbenona	305	4,63	350	18,43	215	2,58
geraniol	480	29,01	383	18,00	194	0,92

A análise dos dados da Tabela III, permite verificar que para a injeção direta, a variação de área é menor do que para o caso da análise por SPME. No caso da análise por SPME, os dados obtidos com a fibra de CW-DVB apresentaram menor variação do que para aqueles obtidos com a fibra PDMS.

A reprodutibilidade variou de 0,92 a 29,01% sendo maior para os monoterpenos oxigenados, quando analisados por PDMS. Na fibra de CW-DVB, a verbenona apresentou menor valor de %RSD. Na fibra de PDMS, o composto com menor %RSD foi o 2-careno e por injeção direta, o composto com menor %RSD foi o geraniol. O geraniol foi o composto que apresentou maior valor de %RSD na análise realizada com CW-DVB.

4.4 Condições para análise por HS-SPME

4.4.1 Tempo de exposição (te)

O tempo de exposição da fibra à amostra foi determinado graficando-se a área de cada analito pelo tempo de exposição. Idealmente, espera-se que haja um equilíbrio, ou seja, que tenha um tempo de exposição a partir do qual a resposta do analito seja constante. A partir deste tempo, pode-se considerar que o analito tenha atingido o equilíbrio e, portanto, pode-se considerar que aquele seja o tempo adequado de exposição. Desta forma foram construídos gráficos de tempo de exposição (5, 15, 30 e 60 minutos) *versus* área relativa (item 3.3) para cada composto. A partir destes dados, construiu-se a Tabela IV que apresenta os tempos de exposição, para cada monoterpeno presente na solução padrão, ao atingir o patamar da curva. O parâmetro “tempo de exposição” foi determinado para as duas fibras (PDMS e CW-DVB). As análises foram realizadas em GC-FID, nas condições apresentadas na Tabela I.

Tabela IV: Tempo de equilíbrio (T_{eq}) de padrões de monoterpenos utilizando as fibras de CW-DVB e PDMS.

Composto	CW-DVB (min)	PDMS (min)
α -pineno	30	> 60
Mirceno	> 60	> 60
2-careno	> 60	>60
α -terpineno	> 60	> 60
Limoneno	> 60	> 60
Linalol	30	> 60
Cânfora	15	> 60
Verbenona	30	> 60
geraniol	> 60	> 60

Pela Tabela IV observa-se que o equilíbrio fibra-*headspace* para os compostos α -pineno, linalol, cânfora e verbenona, na fibra mista de CW-DVB, é atingido em um tempo menor do que com a fibra de PDMS. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que os compostos mais voláteis tendem a concentrarem-se mais na fase *headspace*, como é o caso dos monoterpenos não-oxigenados e oxigenados. Entretanto, como a fibra mista possui características mais polares que a fibra de PDMS, espera-se que a afinidade pelos monoterpenos polares ou menos polares (α -pineno) que estiverem presentes no *headspace* seja maior.

O método de análise por componentes principais (PCA) foi aplicado aos dados gerados nesse estudo com o objetivo de avaliar se as variações foram significativas, para os conjuntos de monoterpenos.

Após o auto-escalamento, o programa apresentou os valores de *scores* e os valores de *loadings* dos dados em um gráfico bidimensional das componentes principais, conforme os representados nas Figuras 9 e 10. A PCA mostra que as duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2 explicam 94% da variância total do sistema.

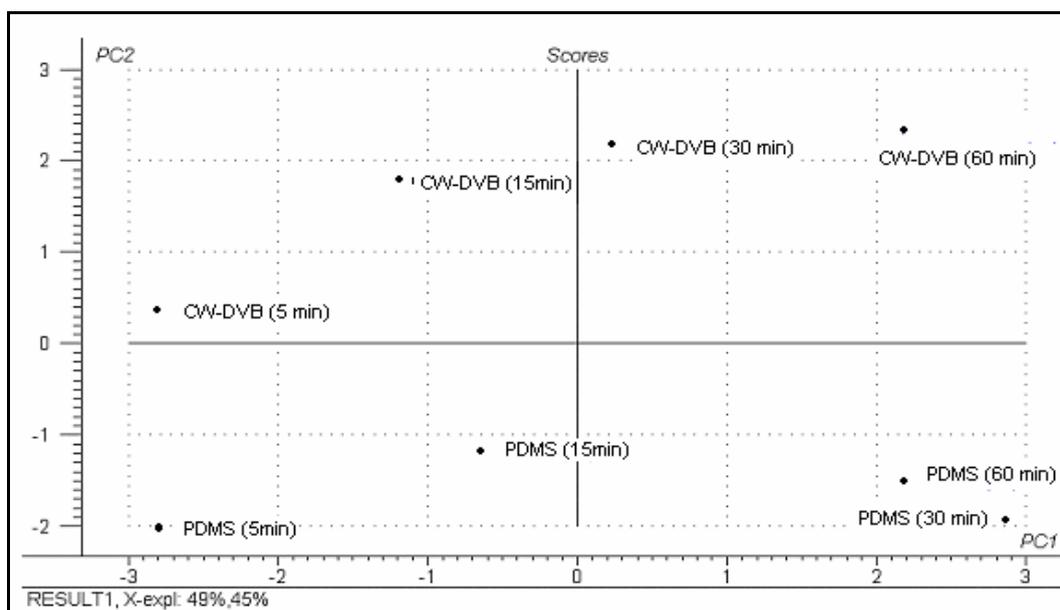


Figura 10: Gráfico bidimensional PC1 x PC2 dos *scores* para diferentes tempos de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.

Observa-se, no gráfico da Figura 10, que a primeira componente principal, PC1, está relacionada com o tempo de exposição e a segunda componente principal está relacionada

com o tipo de revestimento. A PC1 explica 49% da variância dos dados e separa as análises de PDMS realizadas em tempos menores (5 e 15 minutos) de tempos maiores (30 e 60 minutos). A PC2, em valor de significância se aproxima da PC1, pois é responsável por 45% da variância do sistema. Ela leva em consideração o tipo de revestimento separando a fibra de PDMS da fibra de CW-DVB.

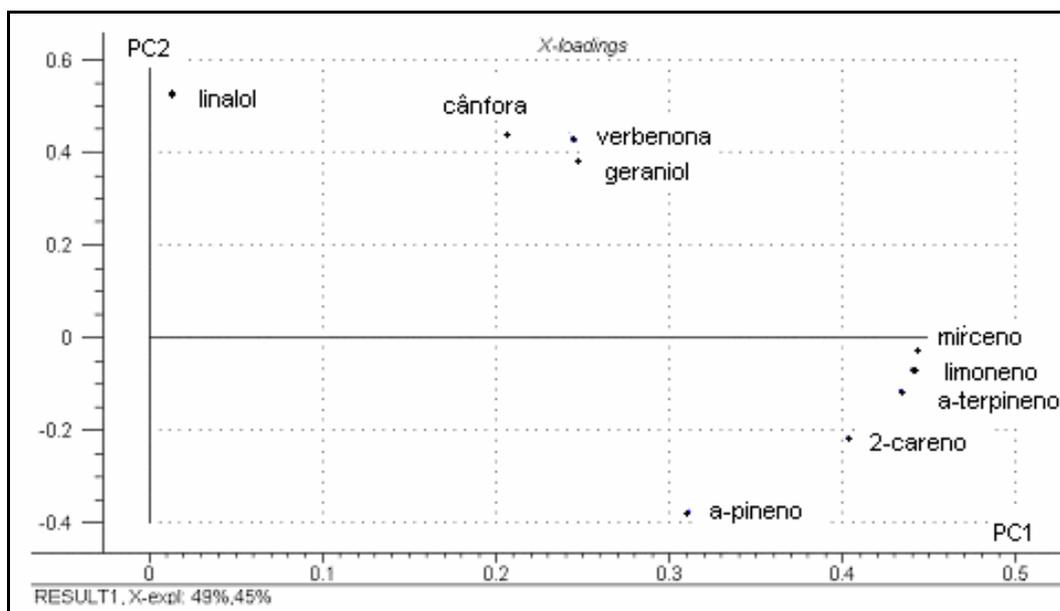


Figura 11: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes tempos de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.

Pelo gráfico de *loadings*, apresentado na Figura 11, observa-se que os monoterpêneos não-oxigenados possuem maior preferência pela fibra de PDMS, principalmente em tempos de 30 e 60 minutos de exposição. Os monoterpêneos oxigenados, por se destacarem na PC2, estão mais presentes na fibra de CW-DVB. O linalol apresenta concentração relativa maior em tempos menores. Já a cânfora, verbenona e geraniol apresentam maior concentração relativa nos tempos de 15 e 30 minutos. E os compostos mirceno, limoneno, 2-careno, α -terpineno e α -pineno apresentam maior concentração relativa em tempos maiores.

Para visualizar melhor o comportamento de cada fibra, optou-se por construir gráficos separados. Nas Figuras 12 e 13, estão representados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, somente para a fibra de PDMS.

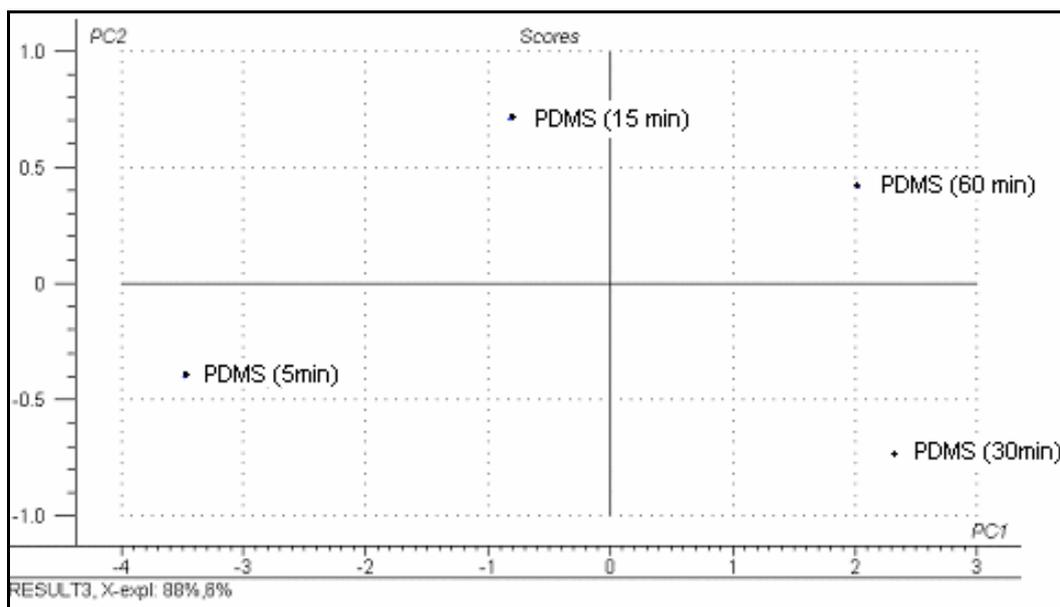


Figura 12 – Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *scores* para diferentes tempos de exposição da fibra de PDMS.

A análise do gráfico da Figura 12 permite verificar que a variação ocorrida com a fibra de PDMS é explicada pela PC1 em 88%, com relação a 6% da contribuição da PC2. A PC1 separa a análise realizada em 5 minutos das demais. E a PC2 separa as análises realizadas nos tempos de 5 e 30 minutos, das análises realizadas em tempos de 15 e 60 minutos.

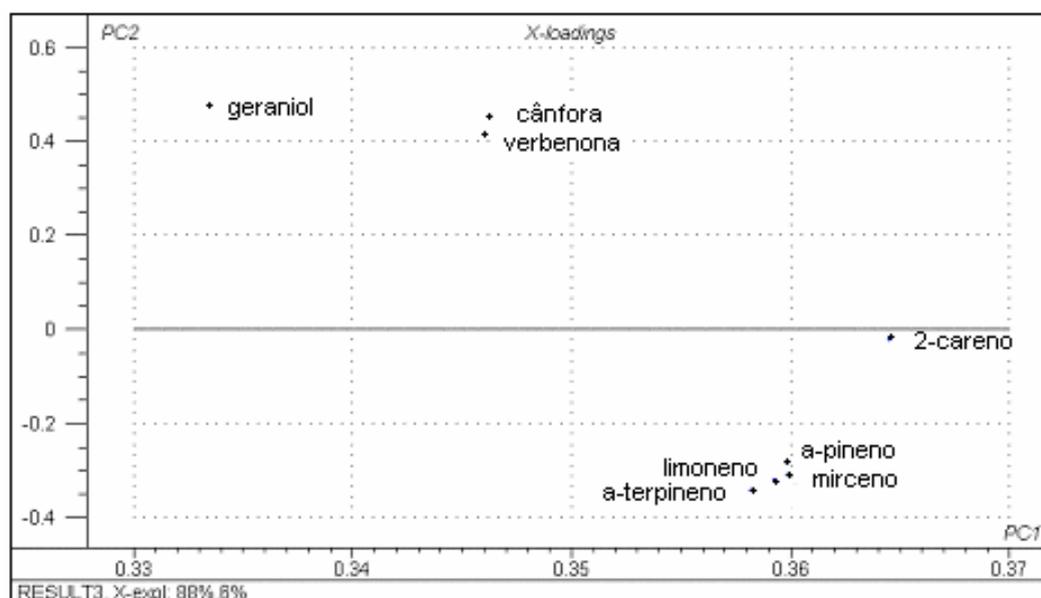


Figura 13 – Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes tempos de exposição da fibra PDMS.

O gráfico da Figura 13 pode indicar quais os compostos responsáveis por essa separação. No tempo de 5 minutos de exposição, a fibra de PDMS é pobre nos compostos não-oxigenados e rica em geraniol. Em tempos maiores (30 e 60 minutos), essa preferência inverte, e a fibra é enriquecida pelos monoterpenos não-oxigenados. Em tempos de exposição próximos de 15 minutos, a afinidade do revestimento é maior pela cânfora e verbenona. Na Figura 14 está representado o gráfico de scores para a fibra de CW-DVB.

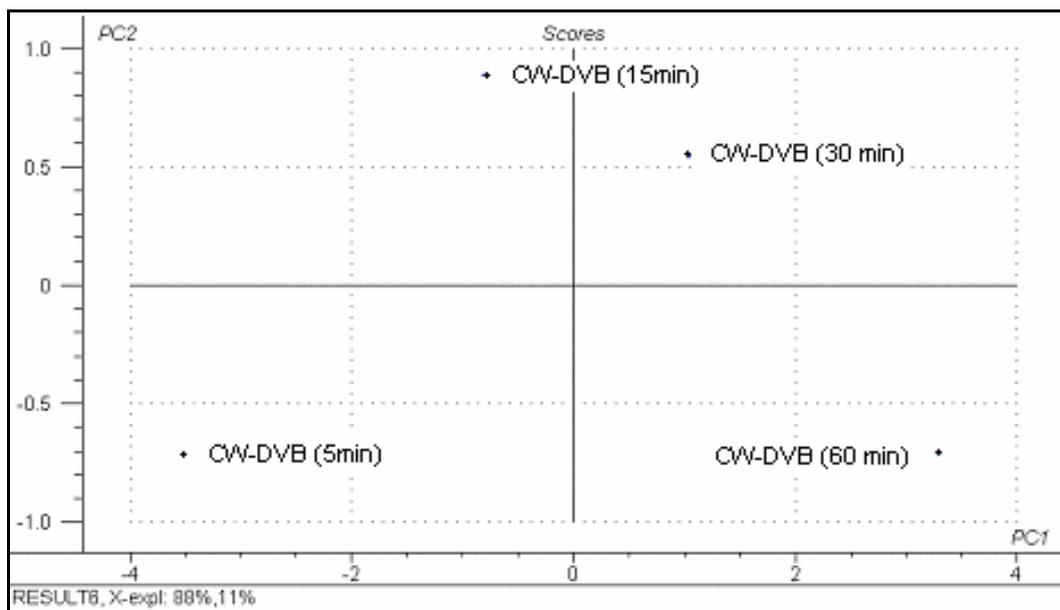


Figura 14 – Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos scores para diferentes tempos de exposição da fibra de CW-DVB.

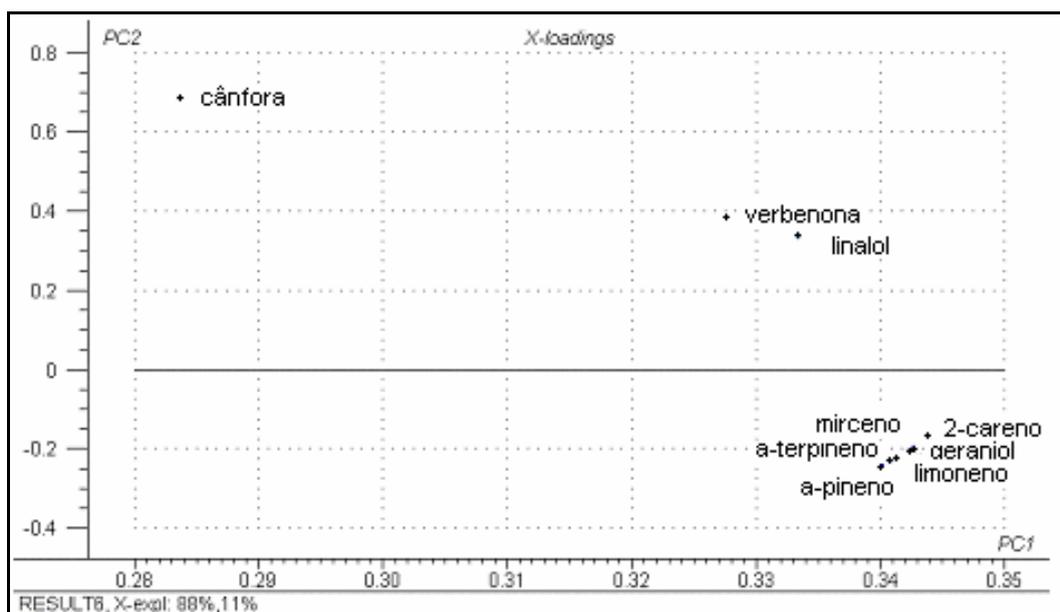


Figura 15 – Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos loadings para diferentes tempos de exposição da fibra de CW-DVB.

A análise conjunta dos gráficos da Figura 14 e 15 permite inferir que no tempo de exposição de 5 minutos, a fibra de CW-DVB apresenta uma maior preferência pela cânfora, em relação aos demais compostos. Essa preferência muda com o passar do tempo. Ao expor a fibra por 60 minutos, o revestimento de CW-DVB passa a trocar os compostos oxigenados pelos não-oxigenados. Esse tipo de comportamento pode ser característico de fibras com revestimento sólido, como a CW-DVB. O mecanismo envolvido na extração desse tipo de revestimento é adsorção. Nele ocorre uma competição pelos sítios ativos, entre os compostos com baixa afinidade e os compostos com alta afinidade.

4.4.2 Temperatura de exposição

Outro parâmetro a ser estabelecido, é a temperatura de exposição. Sabe-se que a temperatura altera a interação do analito com o revestimento da fibra; alguns aumentam sua interação e outros diminuem com o aumento da temperatura. Para este estudo foi avaliado o comportamento dos terpenos presentes na solução-padrão nas temperaturas de 25°C, 40°C e 50°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), selecionadas de acordo com os dados da literatura^{49,64} e a facilidade de controle do sistema de aquecimento. Os valores de área absoluta foram tratados pela análise multivariada e discutidos a seguir.

A PCA mostrou que a variação é significativa para os monoterpenos oxigenados e não-oxigenados no intervalo de temperatura considerado.

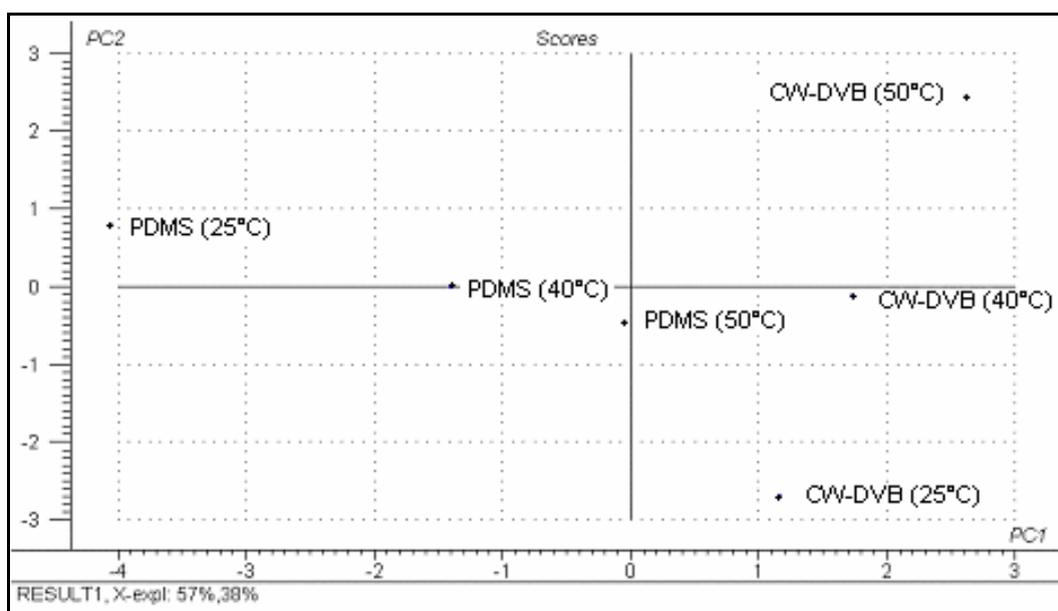


Figura 16 - Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos scores para diferentes temperaturas de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.

A Figura 16 apresenta o gráfico de PC1 *versus* PC2 para os valores de *scores*. A primeira componente principal explica em 57% a variação existente na fibra de PDMS considerando as temperaturas estudadas: 25, 40 e 50°C. A segunda componente principal explica em 38%, que as diferenças são significativas, nas mesmas temperaturas, para a fibra de CW-DVB. Logo, das duas fibras empregadas neste trabalho, a fibra de PDMS é a fibra que apresenta maior variação com relação à temperatura. Este gráfico também permite observar que há uma tendência positiva e linear entre as temperaturas, para ambas as fibras, explicadas pelas diferentes componentes principais. Entretanto, para afirmar tais considerações, seria necessário realizar um número maior de experimentos. Outro dado a ser considerado é a resposta da fibra de PDMS à 50°C. Ela se aproxima daquele apresentado pela fibra de CW-DVB à 40°C.

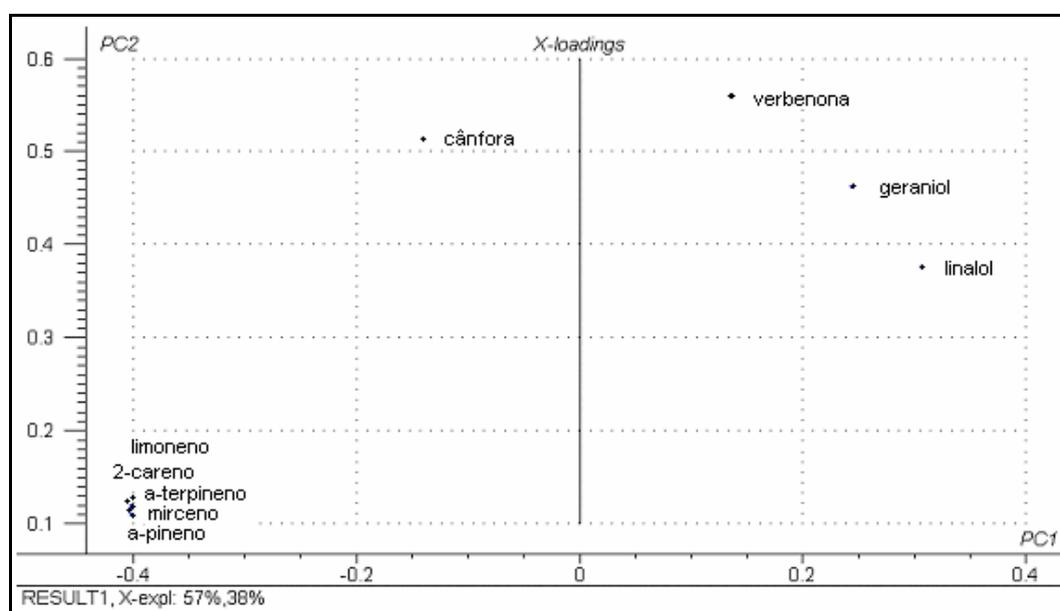


Figura 17: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes temperaturas de exposição das fibras de CW-DVB e PDMS.

No gráfico da Figura 17, pode-se observar que as diferenças apresentadas na PC1 são provocadas pelos monoterpenos não-oxigenados, e na PC2, pelos monoterpenos oxigenados. Observando o gráfico de *scores*, verifica-se que na temperatura de 25°C há uma maior concentração relativa dos monoterpenos não-oxigenados. E isto ocorre nos dois tipos de revestimento. Na HS-SPME, têm-se dois equilíbrios importantes a citar: (1) água/*headspace* e (2) *headspace*/fibra, que podem ser influenciados pela temperatura. Em termos físico-químicos, o aumento da temperatura em sistemas bifásicos enriquecem o vapor com os componentes mais voláteis. Portanto, estes compostos estando em maior concentração no *headspace*, estarão mais disponíveis para serem extraídos pelo

revestimento da fibra. Assim, a tendência é que eles tenham a concentração aumentada na medida de área realizada no cromatógrafo. Os monoterpenos não-oxigenados, por serem mais voláteis, estão em maior proporção no meio *headspace*. À medida que a temperatura é aumentada, ocorre uma permutação destes compostos em detrimento aos monoterpenos oxigenados. Estes, menos voláteis, sofrem um deslocamento no sentido *headspace*, passando a competir com os monoterpenos não-oxigenados presentes também nesta fase.

Os valores de *scores* e *loadings* da fibra de PDMS foram avaliados separadamente e estão apresentados nos gráficos da Figura 18 e 19, respectivamente.

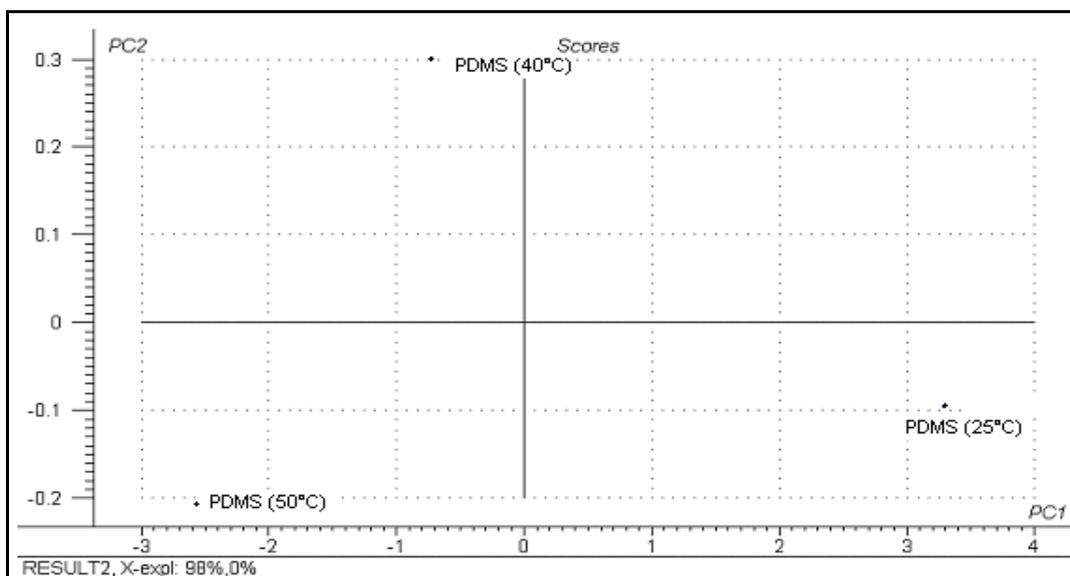


Figura 18: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *scores* para diferentes temperaturas de exposição das fibras PDMS.

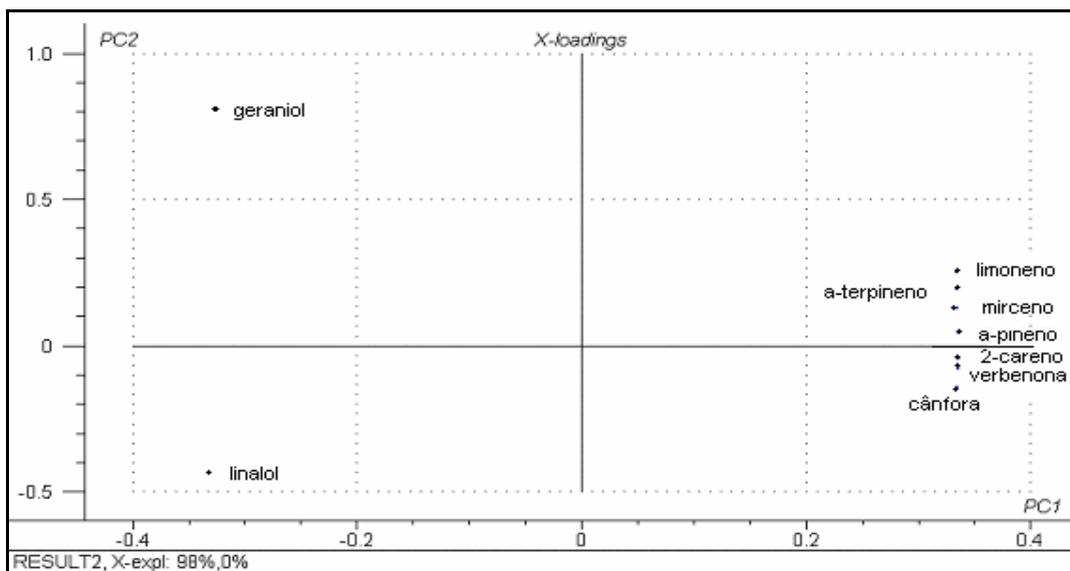


Figura 19: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes temperaturas de exposição da fibra de PDMS.

Analisando em conjunto os dois gráficos acima, nota-se que na temperatura de 25°C há uma predominância dos monoterpenos não-oxigenados e dos oxigenados, cânfora e verbenona. Estes mesmos compostos estão presentes em menores proporções na temperatura de 50°C, onde predominam os compostos linalol e geraniol. Na temperatura de 40°C percebe-se que não há predominância entre os compostos.

A mesma análise foi realizada para a fibra de CW-DVB para os valores de temperatura. Os gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21 referem-se aos valores de *scores* e *loadings*, respectivamente.

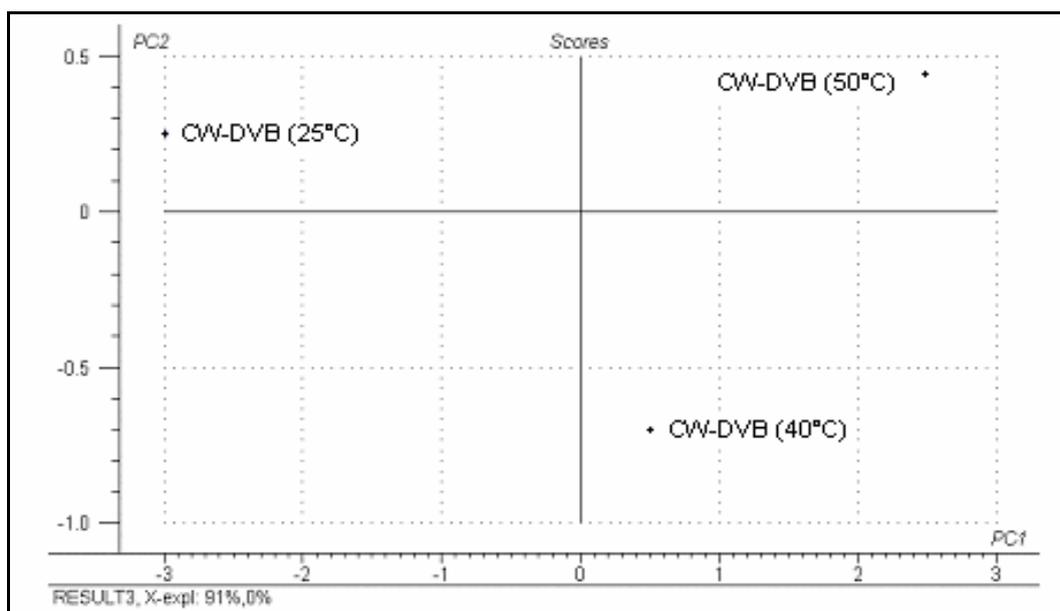


Figura 20: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *scores* para diferentes temperaturas de exposição da fibra de CW-DVB.

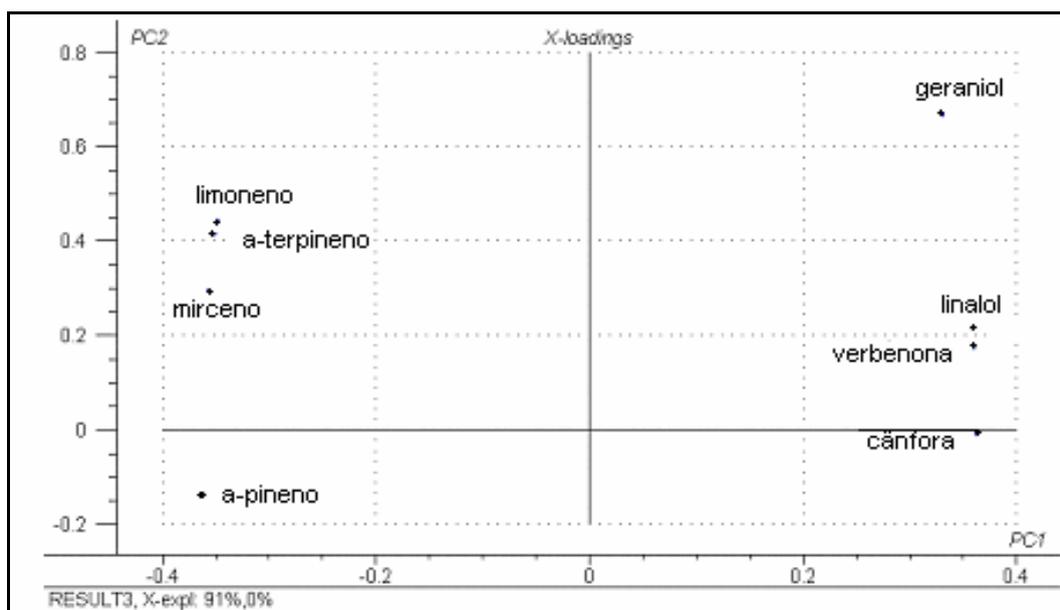


Figura 21: Gráfico bidimensional, PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes temperaturas de exposição da fibra de CW-DVB.

Interpretando os dois gráficos acima, verifica-se que na temperatura de 25°C os compostos que mais são adsorvidos pela fibra são: α -pineno, limoneno, mirceno e α -terpineno. Já à 50°C, os compostos preferenciais são: cânfora, verbenona, linalol e geraniol.

Este comportamento é seletivo no que diz respeito ao tipo de revestimento, pois se observa aumento da concentração de monoterpenos oxigenados nas temperaturas de 40°C e 50°C, pela fibra de CW-DVB e de monoterpenos não-oxigenados nas temperaturas de 25°C e 40°C para a fibra de PDMS. Esta seletividade, ao provocar deslocamento no sentido de um grupo, tende a diminuir no sentido do outro grupo.

A fim de realizar uma interpretação mais adequada destes equilíbrios, faz-se necessário estudos mais detalhados que incluem medidas de *headspace* direto⁶⁵.

4.5 Análise dos compostos presentes na fração volátil das folhas do alecrim

A determinação da composição da fração volátil das folhas de alecrim logo após o corte, foi realizada por HS-SPME, utilizando a fibra de PDMS e GC-ITMSD. O cromatograma apresentou mais de 50 compostos, e destes 46 foram tentativamente identificados utilizando a espectroteca NIST, oito foram identificados por comparação aos espectros de massas dos respectivos padrões cromatográficos. As estruturas de alguns terpenos presentes no óleo essencial de alecrim estão apresentadas na Figura 22. Na Tabela V estão listados os compostos analisados.

Tabela V: Compostos tentativamente identificados com a biblioteca NIST e com padrões, presentes nas folhas de alecrim logo após o corte por HS-SPME.

Ordem de saída	Compostos	t ret. no GC-ITMS	Classificação
1.	m/z 77(35), 93(100), 121(20), 136(10)	10.65	c
2.	α -tujeno	11.02	b, e, j
3.	a-pineno	11.40	a, e, j
4.	canfeno	12.12	b, e, j
5.	sabineno	12.53	b, e/f
6.	b-pineno	13.97	b, e, j
7.	m/z 71(100), 99(80), 129(25)	15.14	c
8.	b-mirceno	15.47	a, e, j
9.	α -felandreno	16.30	b, e, j
10.	a-tepineno	17.50	a, e, j
11.	p-cimeno	18.35	b, e, j
12.	limoneno	18.99	a, e, j

12.	1,8-cineol	18.99	b, d, f, j
13.	(Z)- β -ocimeno	20.37	b, e
14.	(E)- β -ocimeno	21.61	b, e
15.	g-terpineno	22.52	b, e, j
16.	M/z 77(52), 93(100), 121(90), 136(85)	26.64	b, f
17.	terpinoleno	26.92	b, e, j
18.	linalol	28.75	a, f, j
19.	m/z 91(90), 107(100), 122(23)	29.31	c, e/f
20.	2-pinen-7-ona	30.94	c
21.	cânfora	32.83	a, e, j
22.	verbenol	33.33	b, f
23.	tras-pinocanfona	34.64	b, f, j
24.	pinocarvona	34.87	c
25.	borneol	35.25	b, d, f, j
26.	dihidrocarvona/3-pinanona/cis-pinocanfona	35.89	b, d, f
27.	terpinen-4-ol	36.53	b, f, j
28.	α -terpineol	37.89	b, f, g
29.	mirtenol	*	b, f, j
30.	metilchavicol	*	b, f
31.	verbenona	39.35	a, f, j
32.	formato de isobornila	41.07	b, f, g
33.	acetato de mirtenila	*	b, f, g
34.	p-ment-2-en-7-ol	41.90	b, f
35.	o-metiltimol	42.13	b, f
36.	geraniol	42.32	a, f, j
37.	geranial	*	b, f, j
38.	m/z 67(80),107(100), 122(60)	45.83	c
39.	acetato de bornila	45.96	b, g, j
40.	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	49.07	b, e
41.	geranoato de metila	49.20	b, f, g
42.	m/z 67(100), 81(85), 95(65), 109(15), 123(32), 164(25)	49.85	b, e
43.	acetato de nerila	51.69	c
44.	m/z 93(100), 107(52),121(87), 136(25)	52.10	c
45.	m/z 91(100), 107(85), 135(57),150(72)	54.02	c
46.	metil eugenol	*	b, g, j
47.	isocariofileno	54.46	b, h, j
48.	b-cariofileno	55.34	b, h, j
49.	2-etilideno-6-metil-3,5-heptadienal	*	b, i
50.	a-cariofileno	57.05	b, h, j
51.	cedreno	60.11	b,
52.	óxido de cariofileno	62.02	b, i, j

Nota: a = identificação com padrão; b = tentativamente identificado; c = não identificado; d = coeluição com o composto de baixo; e = monoterpeneo não-oxigenados; f = monoterpeneo oxigenado; g = éster; h = sesquiterpenos não-oxigenados; i = sesquiterpenos oxigenados; j = encontrados também na literatura: * = compostos presentes em apenas uma amostra.

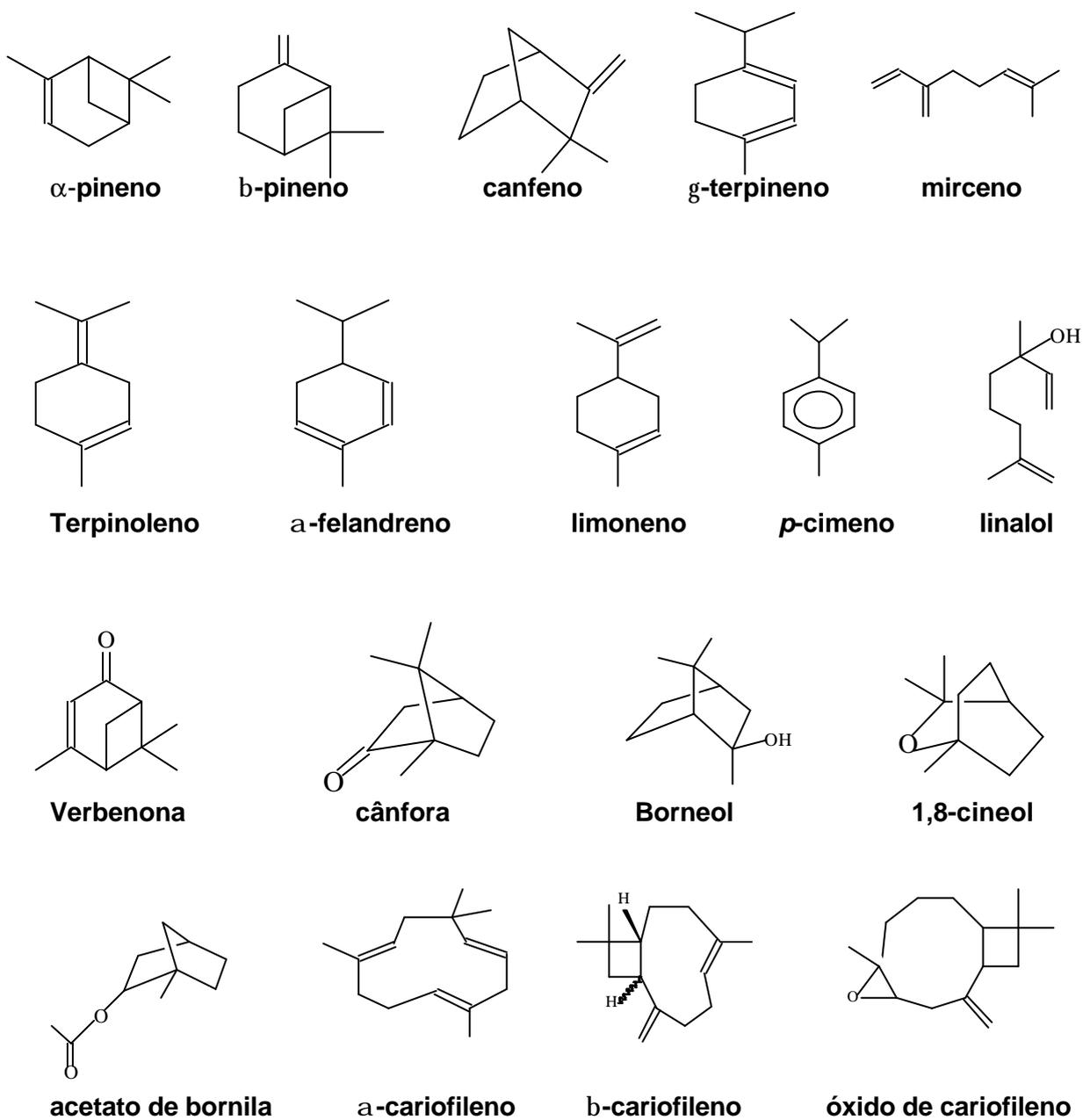


Figura 22: estrutura dos principais compostos presentes na fração volátil do óleo de alecrim.

O cromatograma da Figura 23 é representativo da análise das folhas de alecrim logo após o corte. Nele é possível observar as regiões de maior concentração de não-oxigenados, oxigenados e sesquiterpenos.

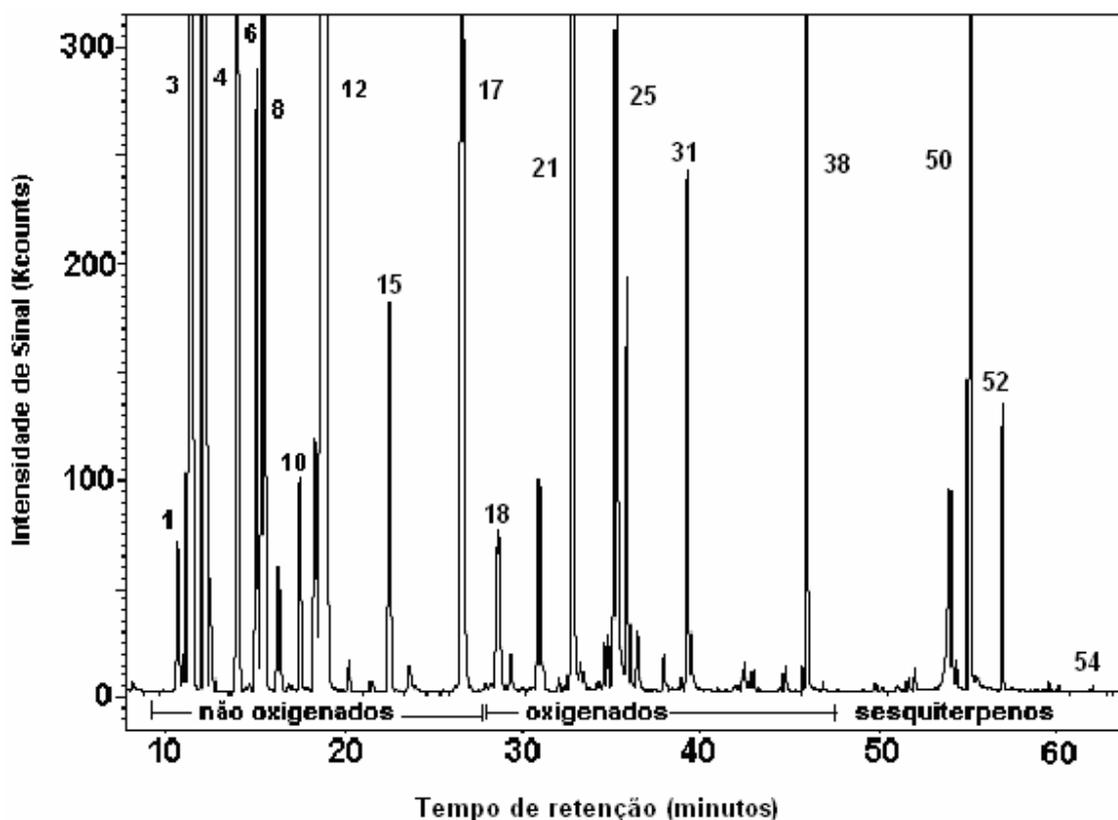


Figura 23: Cromatograma da composição volátil das folhas de alecrim com destaque para alguns compostos apresentados na Tabela V.

Os terpenos majoritários na fração volátil das folhas cortadas foram: α -pineno, mirceno, limoneno/1,8-cineol, cânfora e β -cariofileno.

Os compostos em negrito na Tabela V foram os escolhidos para o monitoramento, por serem os de maior interesse na qualidade do óleo e apresentarem o maior sinal cromatográfico.

4.6 Estudo comparativo dos óleos obtidos por hidrodestilação e SFE, analisados por SPME

A Figura 24 apresenta os cromatogramas de GC-MSD obtidos pela análise das folhas logo após o corte (a), as mesmas extraídas por hidrodestilação (b) e extraídas por

SFE (c). As análises foram realizadas por SPME, nas condições estabelecidas no item 3.2.5.

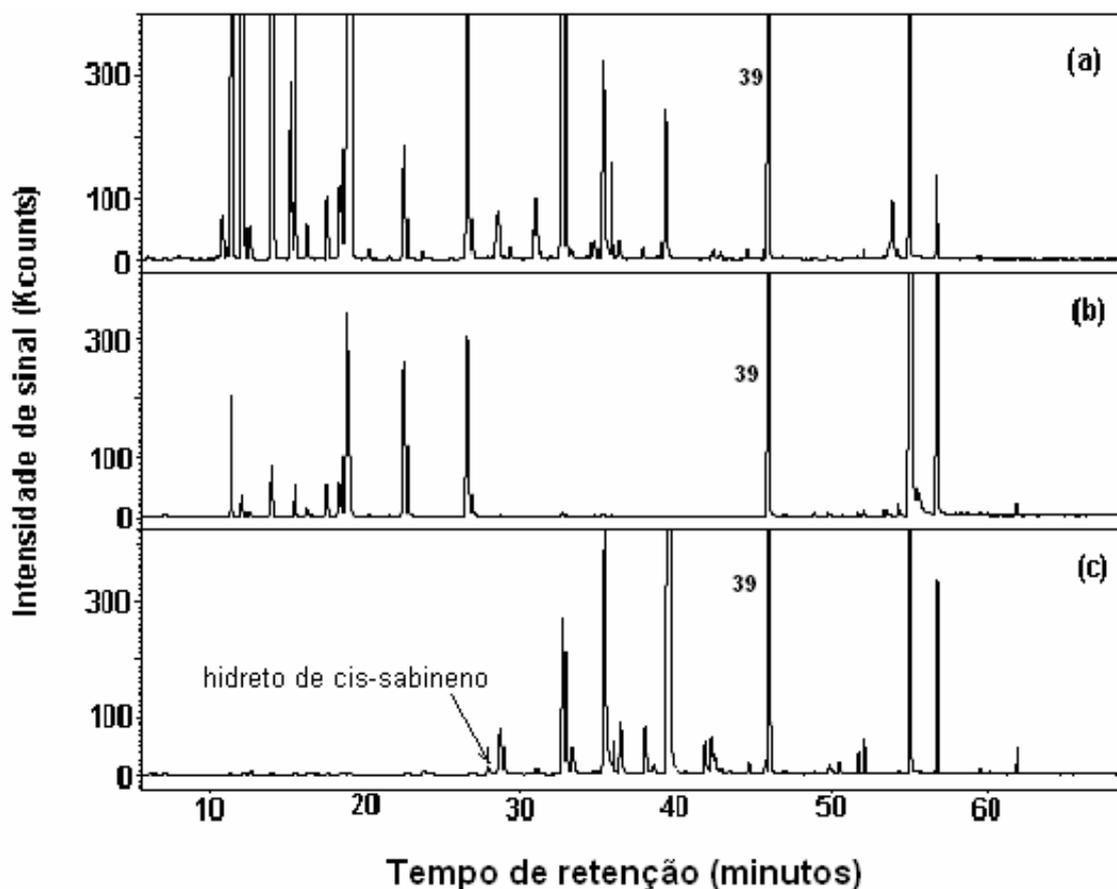


Figura 24: Cromatogramas das folhas cortadas (a), extraídas por hidrodestilação (b) e extraídas por SFE (c), analisadas por SPME no GC-ITMSD.

Em uma primeira observação, é possível verificar que no cromatograma (b) há uma maior concentração de compostos monoterpênicos não-oxigenados (com exceção do acetato de bornila - 39). No cromatograma (c) há predominância de monoterpênicos oxigenados. Com relação aos sesquiterpenos, as técnicas de hidrodestilação e SFE não extraíram significativamente os compostos: 47 (n.i.) e metil eugenol (48), presentes somente na fração volátil das folhas cortadas. O monoterpêneo cis-sabineno hidratado foi encontrado somente nos extratos por SFE. Esse composto transforma-se em terpinen-4-ol e α -terpineol, por secagem com ar quente ou temperatura controlada. Como a SFE utiliza temperatura amena de extração ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), essa transformação pode ser minimizada e até mesmo evitada⁶⁵.

4.7 Comparação entre as análises realizadas por injeção direta e por SPME dos óleos obtidos por hidrodestilação

Na Figura 25 estão os cromatogramas das análises realizadas com o óleo extraído por hidrodestilação, analisado por SPME (a) e por injeção direta (b). A análise por SPME fornece informações relativas à fração volátil da amostra.

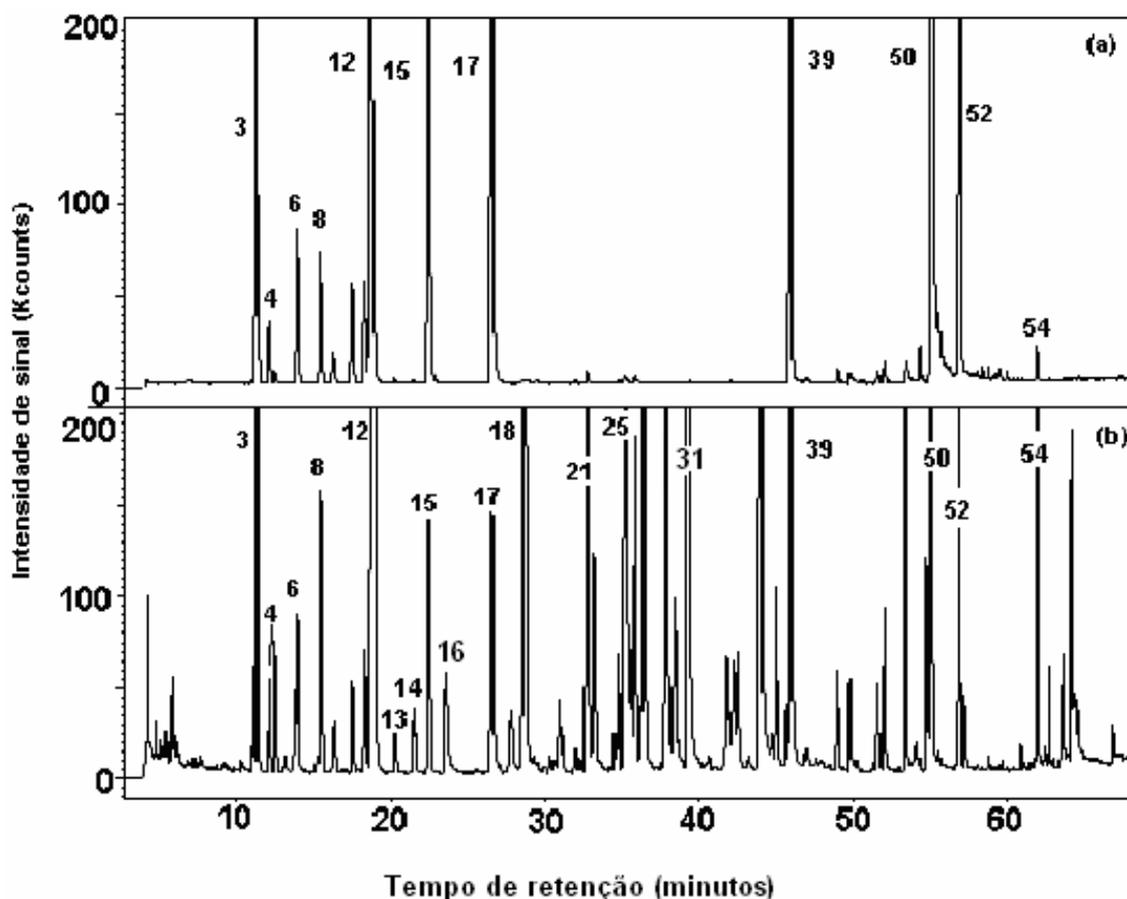


Figura 25: Cromatogramas da fração volátil do alecrim extraída por hidrodestilação e analisada por SPME (a) e por injeção direta (b).

Comparando-se os dois cromatogramas da Figura 25, pode-se avaliar a volatilidade relativa dos compostos presentes no óleo de alecrim obtido por hidrodestilação. Os compostos oxigenados (exceto acetato de bornila -39) estão em menor proporção na fração volátil do óleo. Esses dados podem ser comprovados observando-se a região dos oxigenados nos cromatogramas (a) e (b).

No entanto, alguns monoterpenos não-oxigenados estão em maior concentração na fração volátil do óleo, tais como o sabineno (5), β -pineno (6), (Z)- β -ocimeno (13), (E)- β -ocimeno (14), γ -terpineno (15), (16) e terpinoleno (17).

Os terpenos oxigenados extraídos pelo processo de hidrodestilação são menos voláteis, concentrando-se no óleo propriamente dito e não na fase vapor (volátil).

4.8 Comparação entre as análises por injeção direta e SPME dos óleos obtidos por SFE

Os cromatogramas representativos das análises por SPME (a) e injeção direta (b) do óleo obtido por SFE estão na Figura 26.

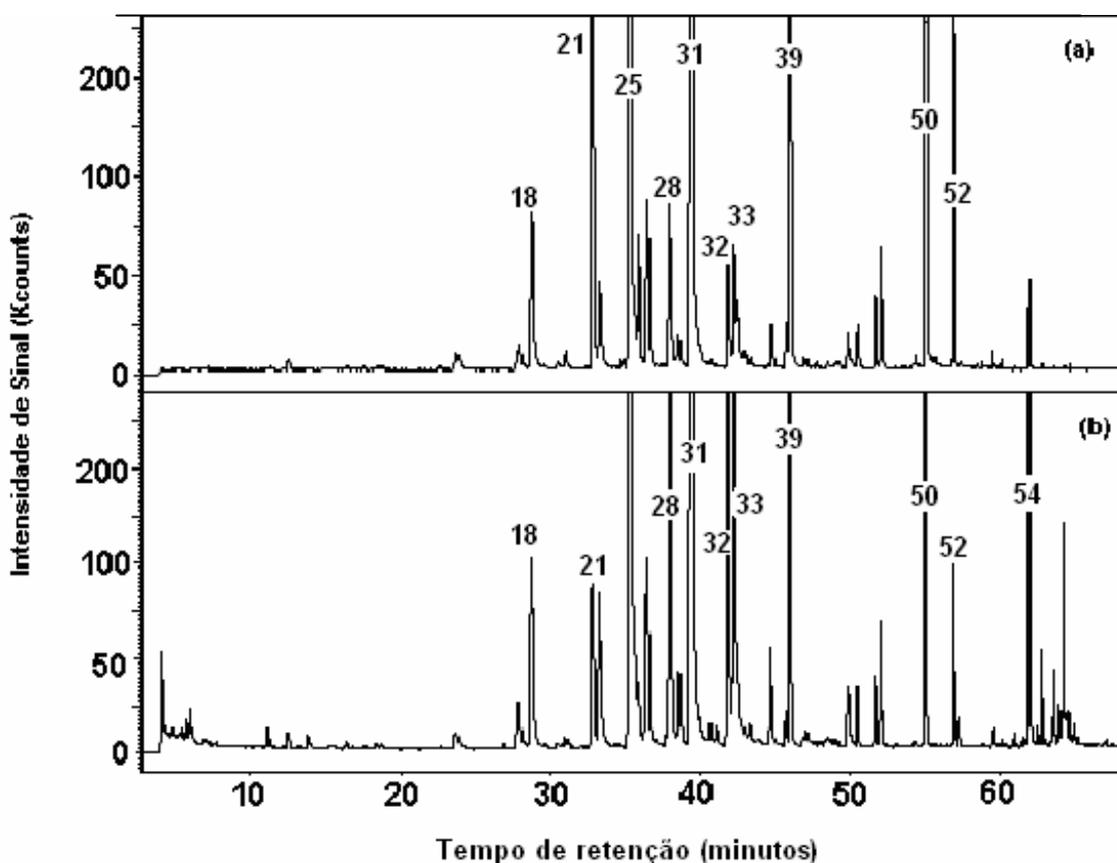


Figura 26: Cromatogramas da fração volátil do óleo extraído por SFE e analisado por SPME (a) e injeção direta (b).

Segundo pode ser visto na Figura 26, a fração volátil do óleo obtido por SFE foi representativa da fração presente no óleo analisado por injeção direta (b). Alguns compostos aparecem com maior intensidade de sinal no cromatograma (a): cânfora (21), borneol (25), verbenona (31), acetato de bornila (39), β (50) e α -cariofileno (52). Outros aparecem com maior intensidade de sinal no cromatograma do óleo: borneol (25), 28,

verbenona (31), formato de isobornila (32), p-ment-2-en-7-ol (33), acetato de bornila (39), β -cariofileno (50) e óxido de cariofileno (54).

Comparando os cromatogramas das Figuras 25 e 26, pode-se inferir que:

na Figura 25, como o *headspace* é rico em não-oxigenados e estes são mais voláteis, há uma maior concentração destes compostos, e como consequência, a fibra fica mais enriquecida destes em detrimento dos demais;

na Figura 26, como a SFE extrai pouco os compostos não-oxigenados, o óleo é rico em oxigenados. Portanto, o *headspace* desta amostra é rico nestes compostos. Assim, os compostos oxigenados serão extraídos pela fibra quase que na mesma proporção que estes se encontram no óleo, pois não haverá competição entre oxigenados e não-oxigenados *headspace*.

4.9 Envelhecimento

4.9.1 Avaliação do efeito de envelhecimento das folhas de alecrim analisadas por SPME

As folhas de alecrim foram analisadas por HS-SPME logo após o corte e diariamente durante um período de 22 dias.

Os cromatogramas gerados pelas análises da folha, logo após o corte (a), 24 horas após (b) e 22 dias após (c), estão apresentados na Figura 27.

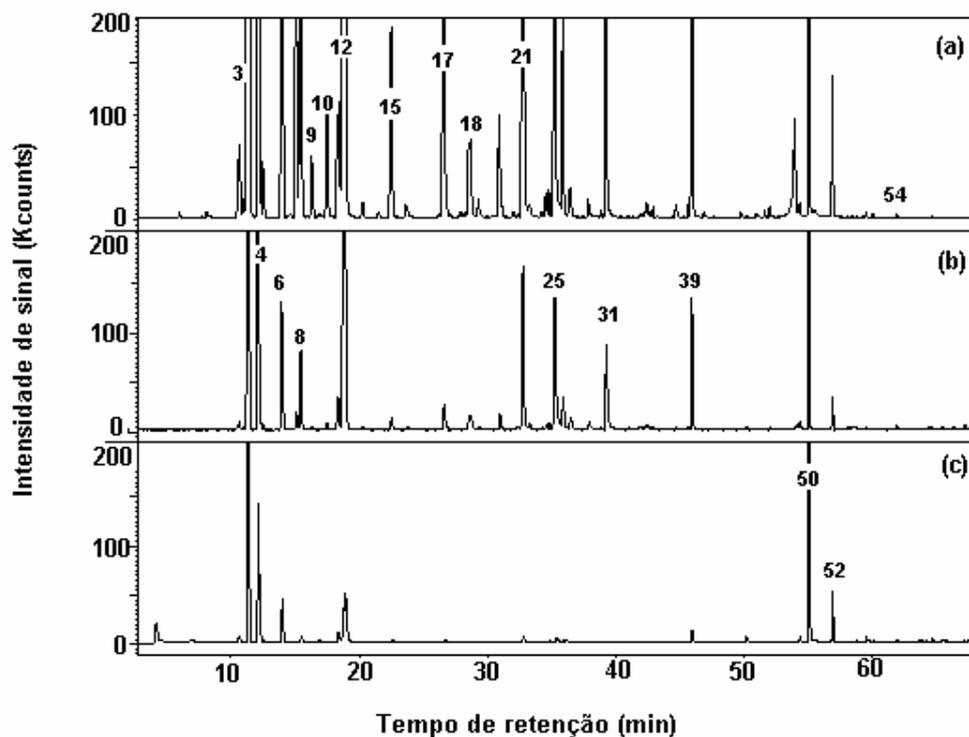


Figura 27: Cromatogramas das análises de envelhecimento por HS-SPME com folhas logo após o corte (a), 24 horas após (b) e 22 dias após o corte (c).

Na Figura 27, verifica-se claramente que os compostos voláteis volatilizam-se das folhas com o decorrer do tempo. No período de 24 horas, os compostos β -pineno (6), β -mirceno (8), α -felandreno (9), α -terpineno (10), γ -terpineno (15), terpinoleno (17), linalol (18), cânfora (21), borneol (25), verbenona (31), acetato de bornila (39) e α -cariofileno (52) foram os mais afetados com respeito à volatilização.

Após 22 dias do corte das folhas, os compostos residuais foram α -pineno (3), canfeno (4), α -terpineno (6), eucaliptol (12), acetato de bornila (39), β -cariofileno (50) e α -cariofileno (52).

Com o intuito de visualizar o comportamento dos voláteis ao longo do tempo, foi construída a Tabela VI. Nela consta o comportamento dos compostos monitorados em quatro dias escolhidos aleatoriamente: logo após o corte, 24 horas (1 dia), 96 horas (4 dias) e 264 horas (11 dias) após o corte, uma vez que não houve grandes variações em todo o período. Para a construção desta Tabela foram atribuídos valores de área relativa, calculadas a partir da soma da área de todos os compostos, sem distinguí-los em não-oxigenados ou oxigenados (ver item 3.3). As variações ocorridas nestas áreas relativas foram classificadas em: maior que 10% (>10%), de 1 a 10% (1-10%), menor que 1% (<1%) e não detectado como (n.d.).

Tabela VI: Terpenos presentes nas folhas cortadas de alecrim, durante o período de envelhecimento, monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 24, 96 e 264 horas após.

Compostos	Após o corte	24h	96h	264h
α -pineno	>10%	>10%	>10%	>10%
canfeno	1-10%	>10%	>10%	>10%
β -pineno	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
mircenol	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
γ -terpineno	<1%	<1%	<1%	<1%
terpinoleno	<1%	<1%	<1%	<1%
cânfora	1-10%	1-10%	1-10%	<1%
borneol	1-10%	>10%	1-10%	<1%
terpinen-4ol	<1%	<1%	<1%	n.d.
verbenona	<1%	<1%	<1%	n.d.
acetato de bornila	1-10%	1-10%	1-10%	<1%
β -cariofileno	<1%	1-10%	1-10%	1-10%
α -cariofileno	<1%	<1%	<1%	<1%
óx. cariofileno	n.d.	<1%	<1%	n.d.

A Tabela VI mostra que os compostos: canfeno e β -cariofileno apresentaram um crescimento em suas áreas relativas a partir de 24 horas após o corte das folhas de alecrim, e mantiveram-se na faixa acima de 10%. Cânfora, terpinen-4-ol, borneol, verbenona e acetato de bornila apresentaram uma diminuição na área relativa no período de 264 horas após o corte das folhas. Destes, o 4-terpineol e a verbenona não foram detectados na análise de 264 horas. O óxido de cariofileno, logo após o corte, não foi detectado mas aparece nas análises de 24 horas e 96 horas, com área relativa constante. Em 264 horas ele não foi detectado. Os demais compostos da Tabela VI mantiveram-se com suas áreas constantes em todo período de análise

Esse estudo foi repetido com outra planta de alecrim da mesma idade que a anterior e seus resultados foram analisados por PCA. No entanto, nesse segundo experimento foi possível acompanhar o envelhecimento das folhas cortadas por um período de 15 dias, analisando os voláteis com dois tipos de revestimento: PDMS e CW-DVB. A discussão dos gráficos gerados pode ser acompanhada no item 4.8.

4.9.2 Envelhecimento das folhas de alecrim analisadas por SPME extraídas por hidrodestilação

A extração por hidrodestilação foi efetuada nas folhas de alecrim logo após o corte e diariamente durante 22 dias.

Na Figura 28 estão apresentados os cromatogramas obtidos após análise do extrato por SPME logo após o corte (a), 24 horas depois (b) e após 22 dias do corte (c).

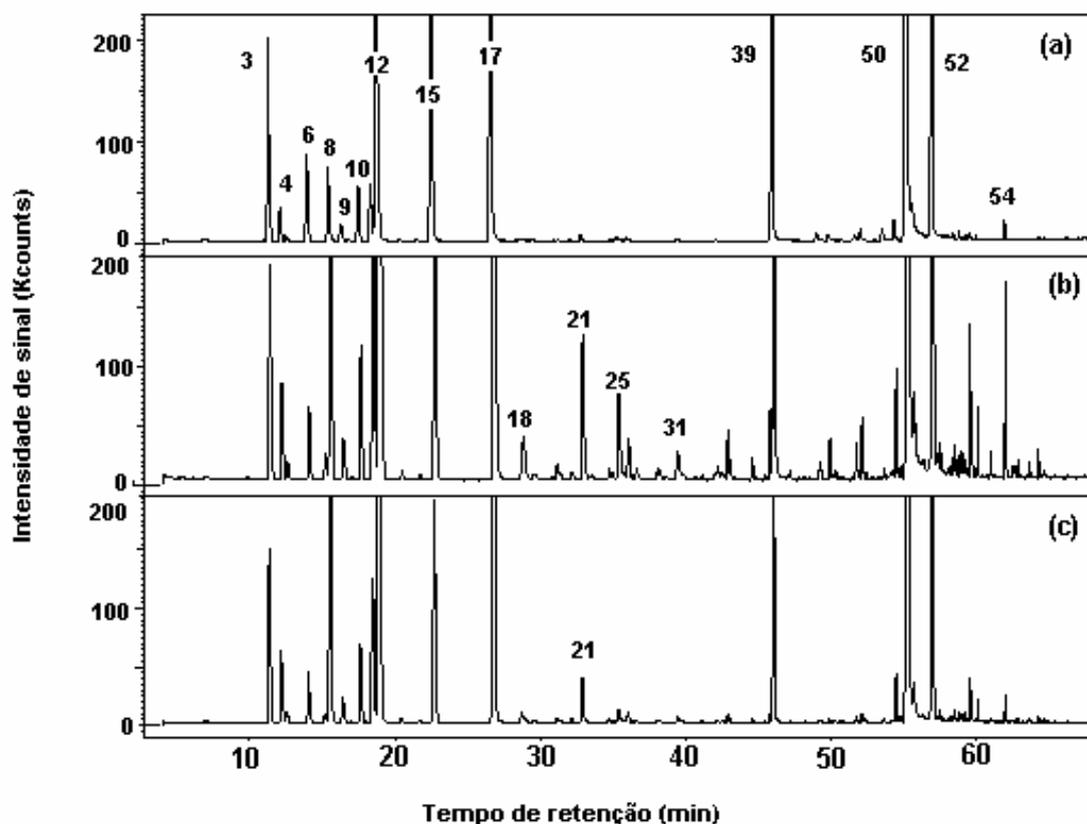


Figura 28: Cromatogramas comparativos do envelhecimento das folhas de alecrim extraídas por hidrodestilação e analisadas por SPME. (a) extração das folhas logo após o corte, (b) extração 24 horas após o corte e (c) 22 dias após o corte.

Na Figura 28 é interessante observar a diferença na proporção dos monoterpenos oxigenados presentes na fração volátil do óleo após 24 horas (1 dia) do corte das folhas. Na fração volátil do óleo hidrodestilado os terpenos majoritários foram: limoneno/1,8-cineol (12), γ -terpineno (15), terpinoleno (17), acetato de bornila (39), β - e α -cariofilenos (50 e 52). Os compostos que permanecem após 22 dias do corte são: α -pineno (3), canfeno (4), β -pineno (6), mirceno (8), α -terpineno (9), limoneno/1,8-cineol (12), γ -terpineno (15), terpinoleno (17), cânfora (21), acetato de bornila (39) e β - e α -cariofilenos (50 e 52).

A Tabela VII apresenta o comportamento dos terpenos presentes nos óleos hidrodestilados, monitorados por HS-SPME. Os tempos escolhidos aleatoriamente para demonstrar esse comportamento foram: logo após o corte, 96 horas (4 dias), 192h (8 dias) e 264 horas (11 dias) após. As variações ocorridas nestas áreas relativas foram classificadas

em: maior que 10% ($>10\%$), de 1 a 10% (1-10%), menor que 1% ($<1\%$) e não detectado como (n.d.).

Tabela VII: Terpenos presentes nos óleos de alecrim, obtidos por hidrodestilação durante o período de envelhecimento, monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 96, 192, e 264 horas após o corte.

Compostos	Após o corte	96h	192h	264h
α -pineno	1-10%	1-10%	$>10\%$	$>10\%$
canfeno	$<1\%$	$<1\%$	1-10%	1-10%
β -pineno	$<1\%$	$<1\%$	1-10%	1-10%
mirreno	$<1\%$	1-10%	1-10%	1-10%
γ -terpineno	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
terpinoleno	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
cânfora	$<1\%$	$<1\%$	$<1\%$	$<1\%$
borneol	n.d.	$<1\%$	$<1\%$	$<1\%$
verbenona	n.d.	$<1\%$	$<1\%$	$<1\%$
acetato de bornila	$>10\%$	$>10\%$	$>10\%$	$>10\%$
β -cariofileno	$>10\%$	$>10\%$	$>10\%$	$>10\%$
α -cariofileno	$>10\%$	1-10%	1-10%	1-10%
óx. cariofileno	n.d.	$<1\%$	$<1\%$	$<1\%$

Pela Tabela VII observa-se que até 264 h, alguns terpenos apresentaram crescimento relativo de área, tais como α -pineno, canfeno, β -pineno, mirreno, borneol, verbenona, óxido de cariofileno. O α -cariofileno apresentou uma diminuição relativa de área, e γ -terpineno, terpinoleno, acetato de bornila e β -cariofileno mantiveram suas áreas relativas constantes durante este tempo.

4.9.3 Envelhecimento das folhas de alecrim analisadas por SPME extraídas por SFE

As extrações por SFE das folhas cortadas de alecrim foram realizadas logo após o corte e diariamente durante um período de 21 dias.

Na Figura 29, o cromatograma (a) representa a análise do óleo obtido por SPME logo após o corte, o cromatograma (b) representa a análise 24 horas após o corte e o cromatograma (c), 21 dias.

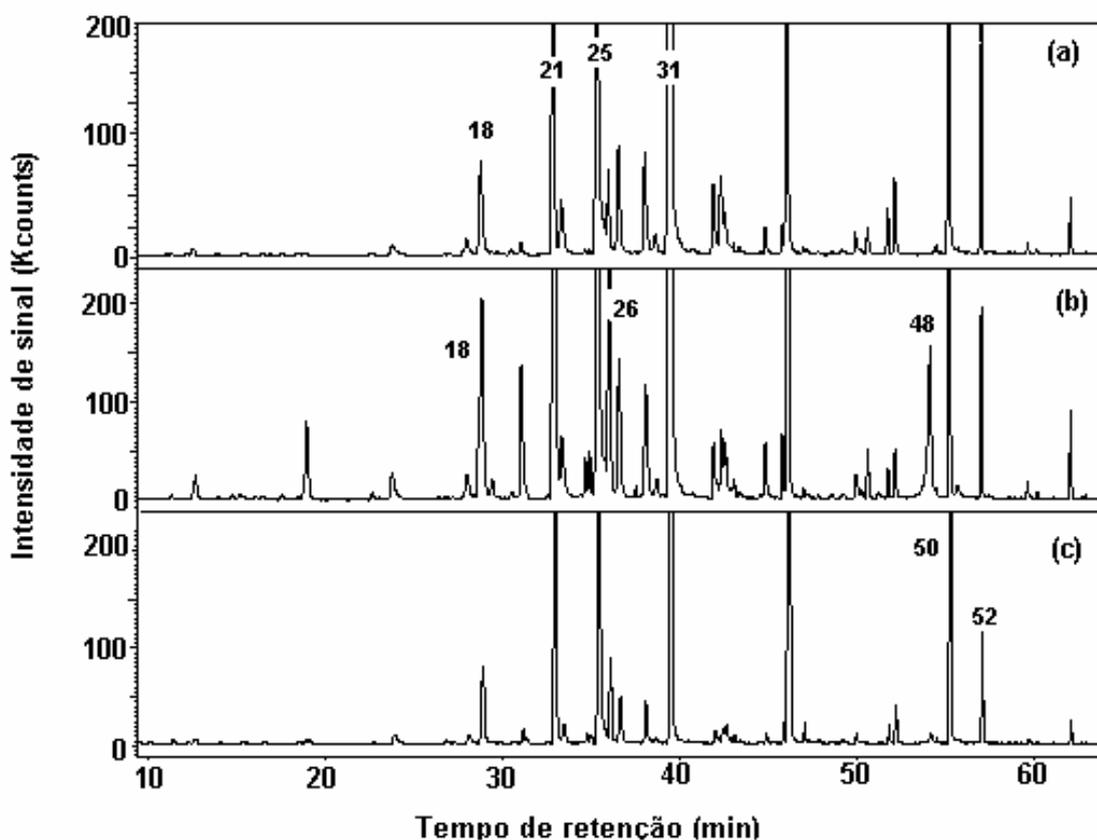


Figura 29: Cromatogramas obtidos a partir das análises da fração volátil do óleo de alecrim extraído por SFE logo após o corte das folhas (a), 24 horas depois (b) e 21 dias após o corte (c).

Através dos cromatogramas acima, observa-se uma maior eficiência na extração de compostos oxigenados voláteis após 24 horas do corte das folhas. O composto (19) foi detectado somente no cromatograma (a).

Após 21 dias do corte, os compostos residuais na fração volátil do alecrim obtido por SFE foram: linalol (18), cânfora (21), borneol (25), hidrocarvona (26), 4-terpineol (27), verbenona (31), acetato de bornila (39) e β e α -cariofilenos (50 e 52).

Na Tabela VIII estão dispostos os terpenos com maior área relativa no óleo extraído por SFE e analisados por SPME nos períodos de, logo após o corte, 144 h (6 dias), 216 h (9 dias) após e 336h (14 dias). As variações ocorridas nestas áreas relativas foram classificadas em: maiores que 10% (>10%), de 1 a 10% (1-10%), menores que 1% (<1%) e não detectado como (n.d.).

Tabela VIII: Terpenos presentes nos extratos de alecrim, obtidos por SFE durante o período de envelhecimento, e monitorados por HS-SPME nos momentos de, logo após o corte, 144 horas, 216 horas e 336 horas após o corte.

Compostos	Após o corte	144h	216h	336h
linalol	1-10%	1-10%	1-10%	n.d.
cânfora	1-10%	1-10%	1-10%	n.d.
borneol	>10%	>10%	>10%	>10%
verbenona	>10%	>10%	>10%	>10%
ac. bornila	>10%	>10%	>10%	>10%
β -cariofileno	>10%	>10%	>10%	>10%
α -cariofileno	1-10%	1-10%	1-10%	1-10%
óx. cariofileno	<1%	1-10%	1-10%	1-10%

A Tabela VIII mostra uma pequena variação na área relativa dos compostos monitorados no período de 336 horas depois do corte das folhas de alecrim, quando extraídos por SFE e analisados por SPME. Na análise realizada em 336 horas, o linalol e a cânfora não foram quantificados. O óxido de cariofileno apresentou menor área relativa logo após o corte, depois variou de 1 a 10% de área, e permaneceu nesta faixa durante todo o monitoramento. Os demais compostos não variaram no intervalo de área estabelecido. O monoterpeneo 1,8-cineol foi detectado em algumas análises, mas não foi persistente para ser considerado. Esse dado não é surpreendente, uma vez que o 1,8-cineol é um composto oxigenado, ideal para ser extraído por esta técnica.

4.10 Análise dos dados de envelhecimento por componentes principais

Todos os dados de hidrodestilação, SFE e folhas, realizadas tanto por injeção direta quanto por HS-SPME, foram auto-escalados e submetidos à análise exploratória por PCA. Os resultados foram graficados relacionando PC1, PC2 e PC3, apresentados nas figuras a seguir.

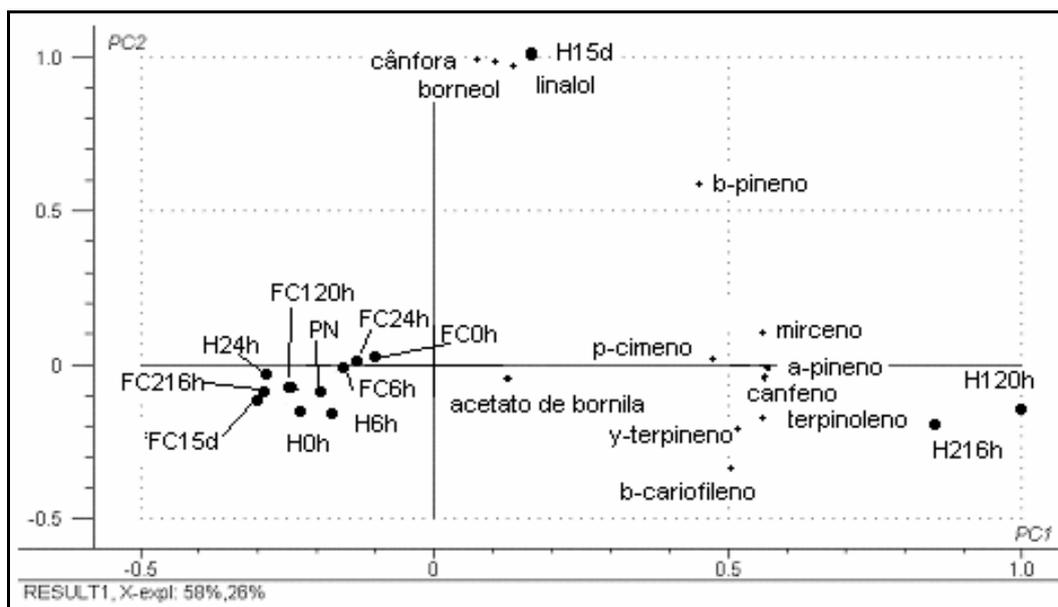


Figura 30: Gráfico *bi-plot* PC1 X PC2 do acoplamento dos dados de envelhecimento das folhas cortadas (FC) com os dados de hidrodestilação (H) e planta normal (PN), analisadas por CW-DVB.

O gráfico da Figura 30 relaciona os dados das folhas cortadas com a planta *in vivo* (em situação normal) e os óleos extraídos por hidrodestilação, analisados por SPME com a fibra CW-DVB nos tempos: logo após o corte (0 h), 6 horas, 24 horas (1 dia), 120 horas (5 dias), 216 horas (9 dias) e 15 dias após o corte.

A PC1 explica 58% da variação ocorrida no sistema enquanto a PC2, 26%. Ou seja, a PC1 mostra que há uma diferença significativa entre FC, PN e H, dos primeiros dias, com H120 h e H216 h. No entanto, não há diferenças entre os dados das folhas cortadas, da planta *in vivo* e dos óleos hidrodestilados nos dias 0h, 6h e 24h. Essa diferença também não aparece para os óleos dos períodos de 120h e 216h. A PC2 demonstrou uma diferença significativa entre a análise do óleo hidrodestilado em 15 dias com as demais amostras. Neste mesmo gráfico estão dispostos os terpenos responsáveis por essas diferenças. O acetato de bornila está mais presente na fração volátil das folhas cortadas e nos óleos hidrodestilados nos primeiros dias. Os compostos α -pineno, canfeno, mirceno, p-cimeno, γ -terpineno, terpinoleno e β -cariofileno estão mais presentes na fração volátil dos óleos hidrodestilados de 120h e 216h. A cânfora, borneol e linalol estão preferencialmente no óleo extraído após 15 dias do corte das folhas.

A PC3 representa 9% da variação do sistema. Na Figura 31 está o gráfico PC1 X PC3 que permite visualizar a influência dessa componente principal no sistema.

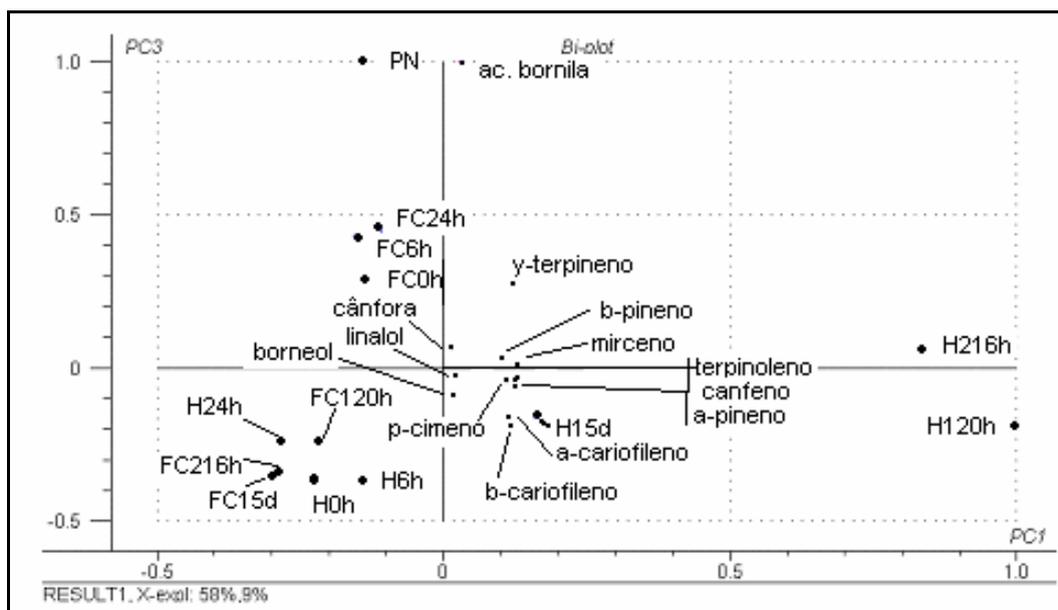


Figura 31: Gráfico *bi-plot* PC1 X PC3 da associação dos dados de envelhecimento das folhas cortadas (FC) com os dados de hidrodestilação (H) analisadas por CW-DVB.

A PC3 separa a planta *in vivo* (PN) dos óleos H24h, H6h, H0h e das folhas cortadas de FC120h e FC216h. Não houve diferença significativa entre FC0h, FC6h e FC24h. Pelo gráfico da Figura 31 verifica-se que na fração volátil da planta há uma maior concentração de acetato de bornila. A Figura 32 apresenta o gráfico de PC1 *versus* PC2 para as mesmas amostras, analisadas por PDMS.

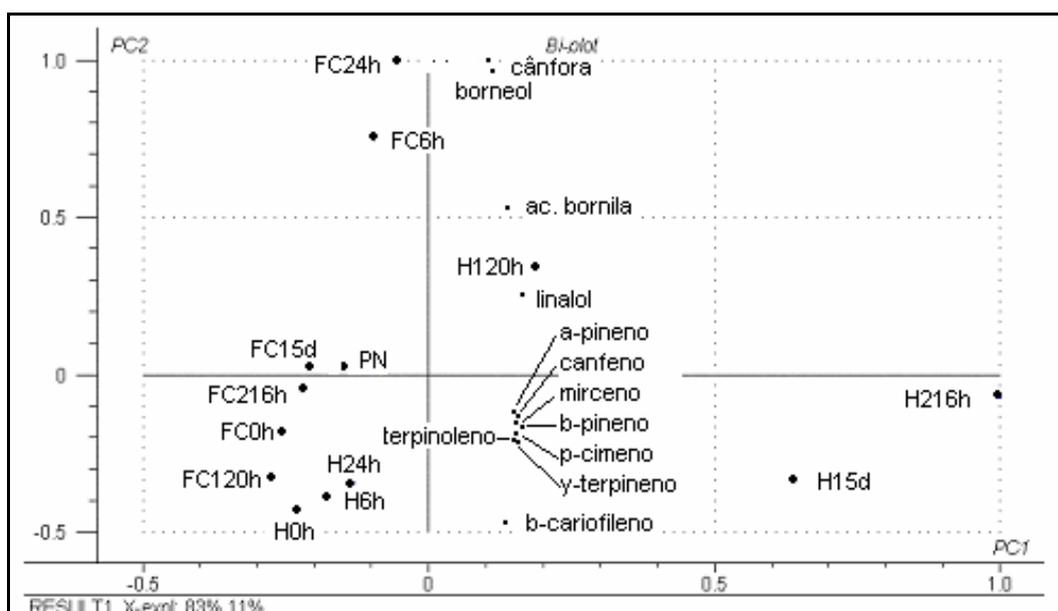


Figura 32: Gráfico *bi-plot* PC1 X PC2 da associação dos dados da planta *in vivo* (PN) com o envelhecimento das folhas cortadas (FC) e os extratos obtidos por hidrodestilação (H), analisados por PDMS.

A PC1 é responsável por 83% da variação do sistema e a PC2, 11%. A PC1 separa os óleos H216 e H15d da FC de 0h, 216h, 120 e 15d e dos óleos hidrodestilados nos primeiros dias. Não foi possível visualizar a influência da PC2 neste gráfico. Percebe-se apenas que na análise de FC24h predominou os terpenos borneol e cânfora.

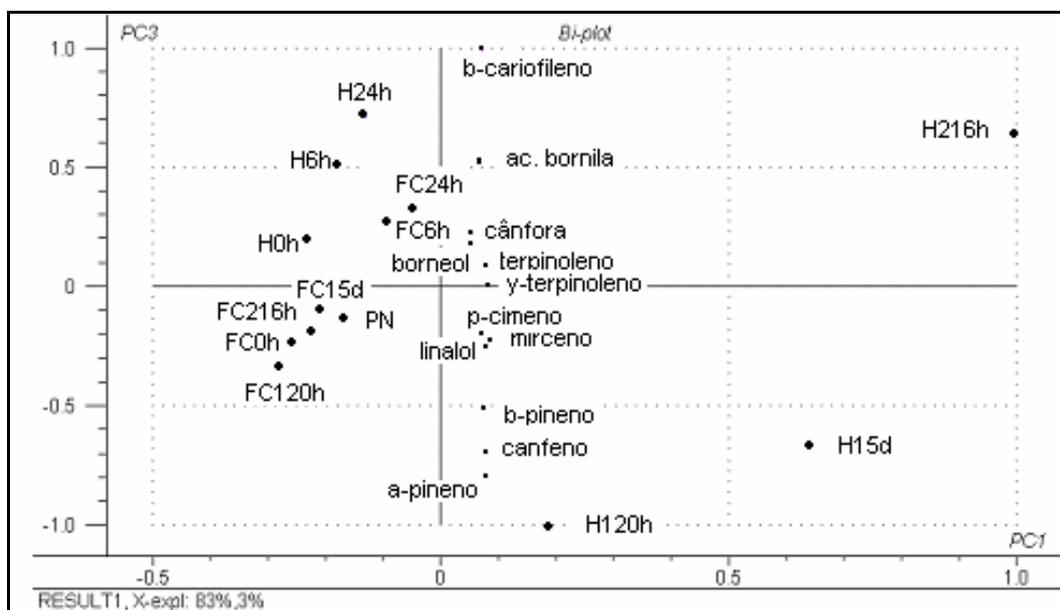


Figura 33: Gráfico *bi-plot* PC1 X PC3 da associação dos dados da planta *in vivo* com o envelhecimento das folhas cortadas (FC) e os extratos obtidos por hidrodestilação (H), analisados por PDMS.

O gráfico da Figura 33 relaciona a PC1 com a PC3, mesmo esta última contribuindo pouco na modelagem do sistema, somente 3%. Ele mostra que o extrato H216h é pobre nos compostos analisados, diferente das análises das folhas cortadas (FC), óleos hidrodestilados dos primeiros dias e PN.

Os óleos extraídos por SFE foram submetidos à análise por PCA, juntamente com os óleos hidrodestilados. Neste estudo foram associados os valores de área absoluta dos compostos principais, analisados tanto por SPME (fibra de PDMS) quanto por injeção direta. O objetivo foi detectar diferenças entre estes dois tipos de análises e verificar se ocorre alguma discriminação da fibra, com relação aos compostos monitorados.

4.11 Perfil cromatográfico da planta *in vivo* de alecrim

Na Figura 35 estão dispostos os cromatogramas da planta de alecrim analisada *in vivo* e logo após o corte por SPME com a fibra de PDMS.

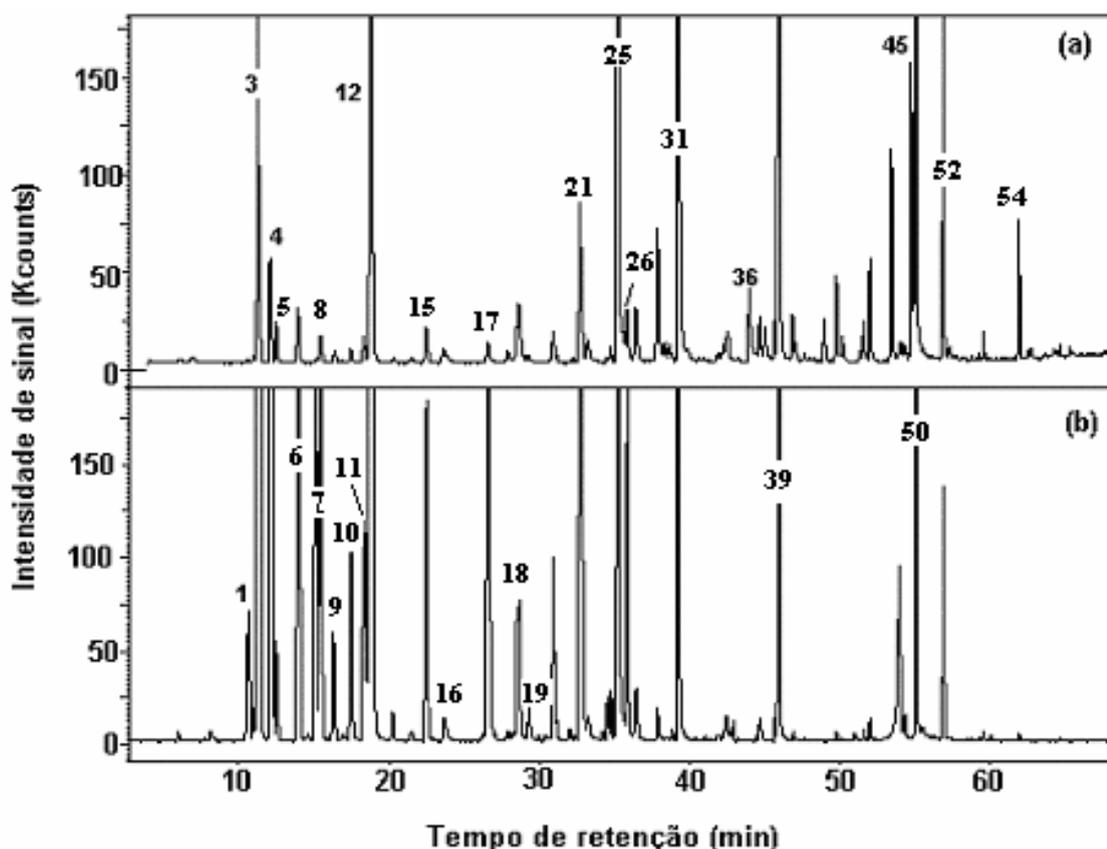


Figura 35: Cromatogramas comparativos da planta analisada *in vivo* (a) e após o corte de suas folhas (b) por GC-ITMSD.

No cromatograma da planta (a) aparece com maior intensidade de sinal os compostos: α -pineno (3), limoneno/1,8-cineol (12), borneol (25), verbenona (31), acetato de bornila (39), e β - e α - cariofilenos (50 e 52) e óxido de cariofileno (54). Os compostos (1) e (19) não foram detectados na planta *in vivo*.

Em observação à Figura 35, especula-se que no momento do corte das folhas, uma maior concentração de terpenos não-oxigenados e oxigenados volatiliza. À este fato sugere-se que tais compostos estejam mais concentrados no interior das membranas que armazenam os óleos essenciais (bolsas secretoras)^{5,6}. Alguns compostos teriam dificuldade de atravessar essa membrana, o que explicam as baixas intensidades dos sinais característicos de oxigenados no cromatograma (a). Ao cortar as folhas, rompem-se as

membranas e tais compostos volatilizam mais facilmente, aumentando a intensidade do sinal cromatográfico. Tais sugestões são difíceis de serem debatidas em virtude do pouco conhecimento deste tipo de comportamento. Associados a estas idéias estariam: os monoterpenos não-oxigenados, em grande proporção e os monoterpenos oxigenados, em pequena proporção. Alguns compostos como borneol e acetato de bornila pouco variaram com o corte das folhas. Os sesquiterpenos apresentaram maior intensidade de sinal no cromatograma da planta *in vivo*.

4.12 Óleos armazenados de alecrim

Oito amostras de óleo de alecrim foram analisadas por injeção direta em GC-MSD. A amostra de mais tempo de prateleira tem aproximadamente seis anos e a amostra mais nova tem quatro meses.

No gráfico da Figura 36 está o comportamento dos monoterpenos não-oxigenados. E na Figura 37, os compostos α -pineno e 1,8-cineol/limoneno, que foram separados do conjunto por apresentarem valores de área superior aos demais compostos do grupo dificultando um pouco a visualização.

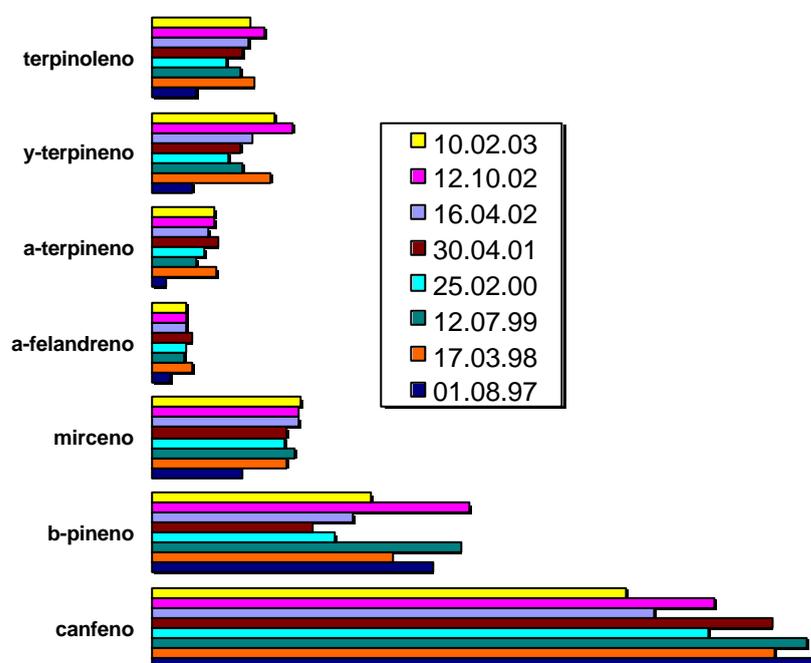


Figura 36: Comportamento dos monoterpenos não-oxigenados nos óleos armazenados de alecrim.

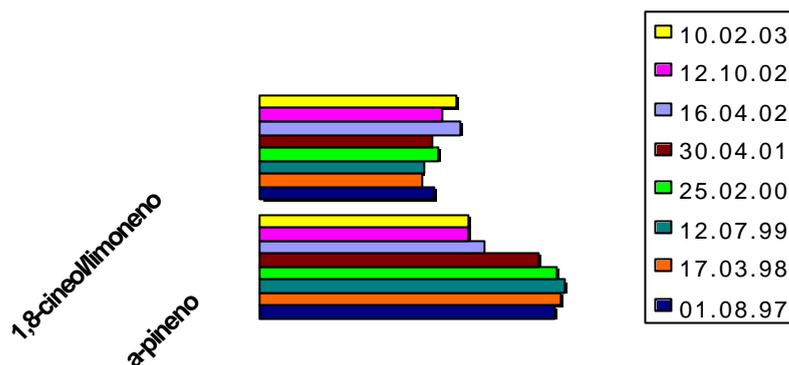


Figura 37: Comportamento do α -pineno, limoneno e 1,8-cineol nos óleos armazenados de alecrim.

Pelas Figuras 36 e 37, pode-se dizer que não há associação evidente entre o tempo de armazenagem e as áreas obtidas. Pode-se inferir apenas que não houve variação drástica no comportamento dos monoterpenos não-oxigenados. Entretanto, o interessante nas Figuras 36 e 37 é verificar que compostos como canfeno e α -pineno apresentam maior proporção relativa nos óleos mais velhos, de 01/08/1997 e 12/07/1999, respectivamente. Os demais compostos mostram um perfil inverso, possuem maiores proporções relativas em óleos mais novos. Mirceno, α -terpineno, α -felandreno, 1,8-cineol/limoneno foram aqueles que pouco variaram na composição do óleo de alecrim nos últimos cinco anos.

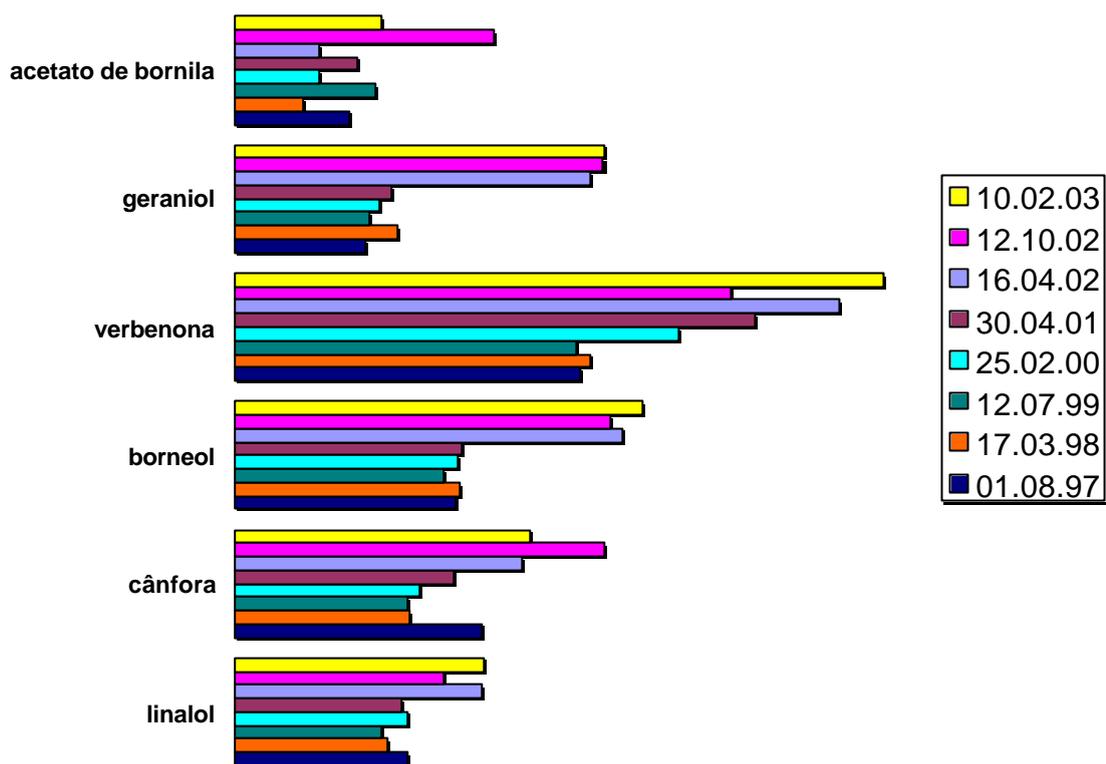


Figura 38: comportamento dos monoterpenos oxigenados nos óleos armazenados de alecrim.

Observando a Figura 38 verifica-se que os compostos oxigenados pouco variaram na composição do óleo de alecrim nos últimos seis anos. Contudo, estes variaram mais que os compostos não-oxigenados, segundo podem ser acompanhados na Figura 36. Pode-se ainda inferir que há uma maior proporção de oxigenados nos óleos de 16/04/2002, 12/10/2002 e 10/02/2003, quando comparadas às demais datas.

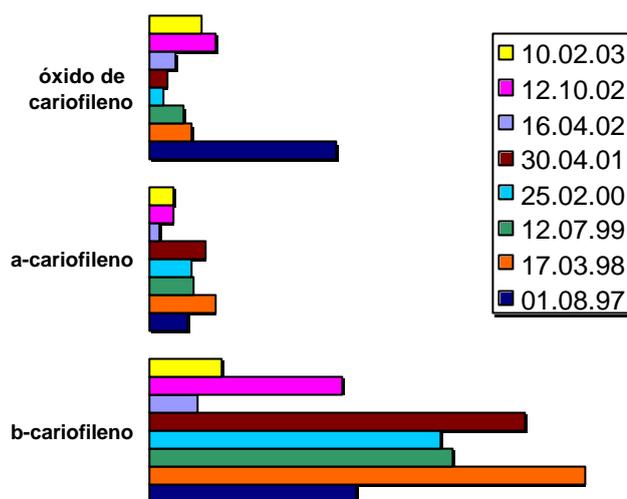


Figura 39: Comportamento dos sesquiterpenos nos óleos armazenados de alecrim.

Como pode ser verificado na Figura 39, os sesquiterpenos foram os compostos que mais variaram em proporção relativa no óleo de alecrim.

A partir destes dados, pode-se discutir sobre a viabilidade de armazenamento do óleo de alecrim por um período de até seis anos.

4.13 Estresse

As variações na fração volátil da planta *in vivo* do alecrim, provocadas por ausência de água, foram detectadas pelas fibras de PDMS e CW-DVB. Em um primeiro momento foi determinado o perfil normal da planta, depois foi provocada a desidratação da mesma durante um período de oito dias.

As Figuras 40 a 42 apresentam os cromatogramas da fração volátil da planta de alecrim quando analisadas por SPME, com as duas fibras: PDMS (Figuras 40 e 41) e CW-DVB (Figuras 42 e 43).

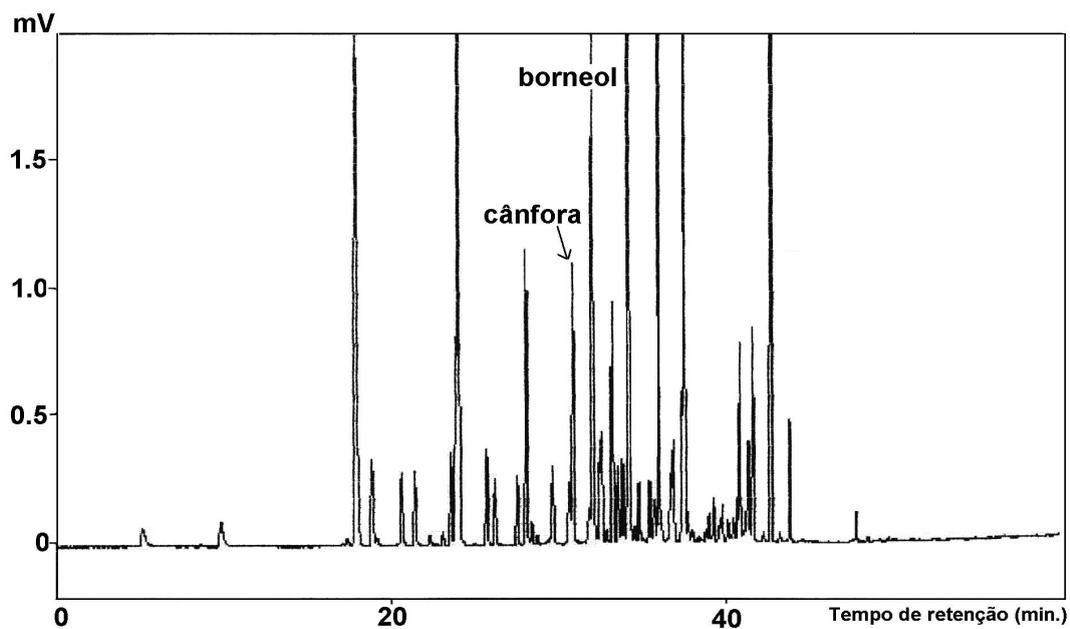


Figura 40: Cromatograma da planta *in vivo* analisada por PDMS em situação normal.

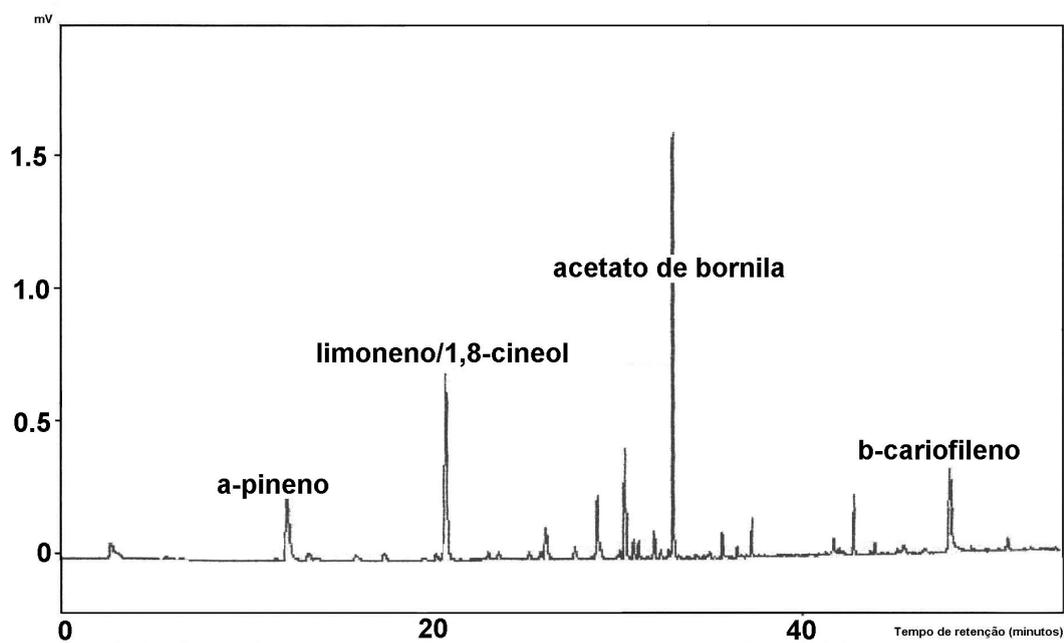


Figura 41: Cromatograma da planta *in vivo* analisada por PDMS após oito dias sem água.

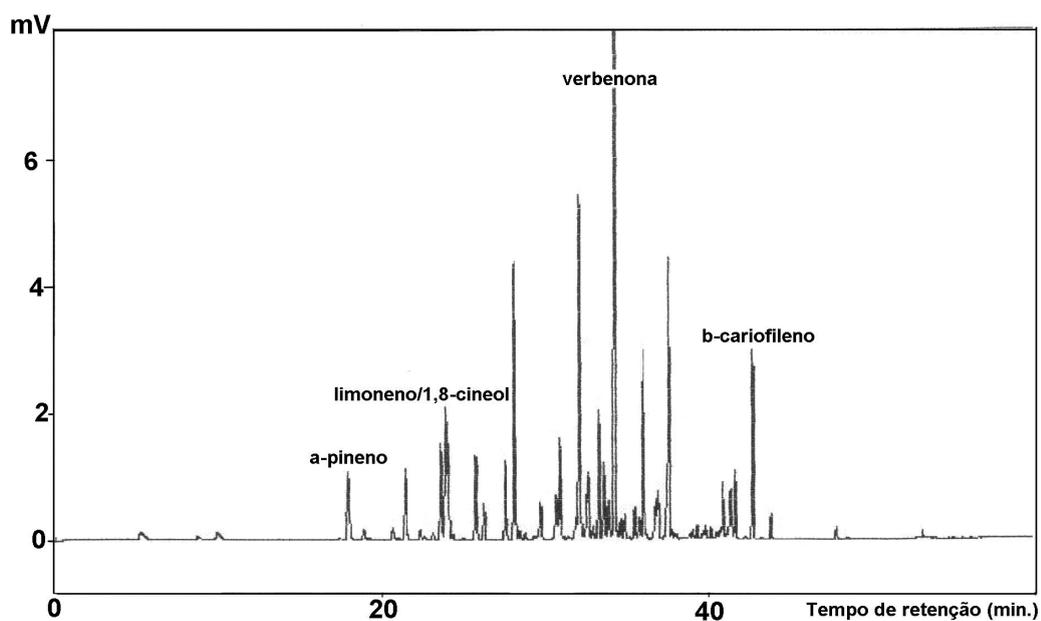


Figura 42: Cromatograma da planta *in vivo* de alecrim, analisada por CW-DVB, em situação normal de cultivo.

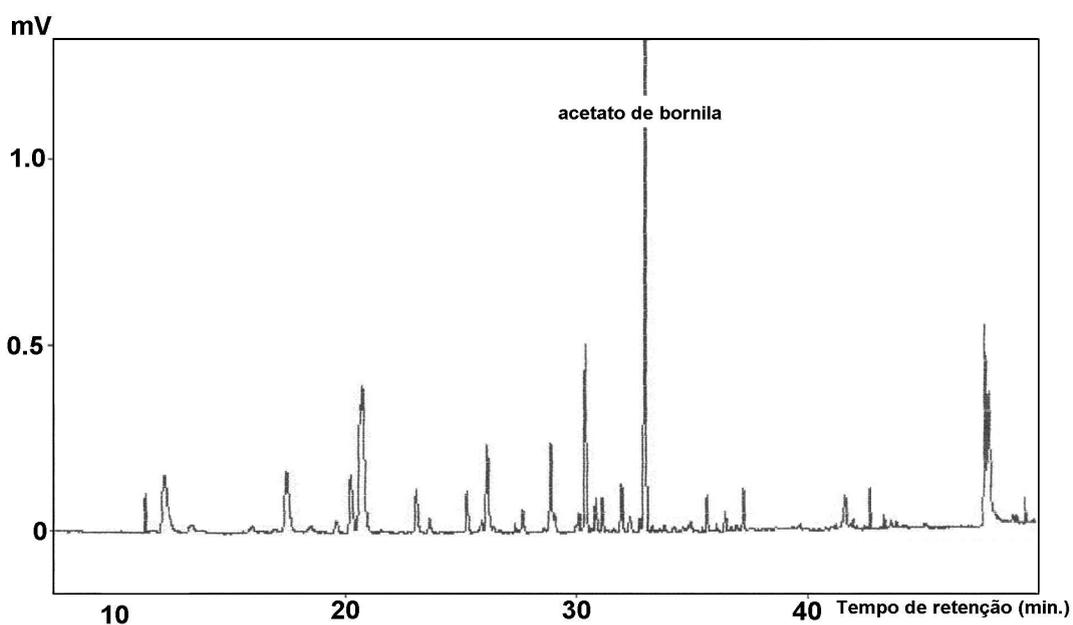


Figura 43: Cromatograma da planta *in vivo* de alecrim, analisada pela fibra CW-DVB, após oito dias sem água.

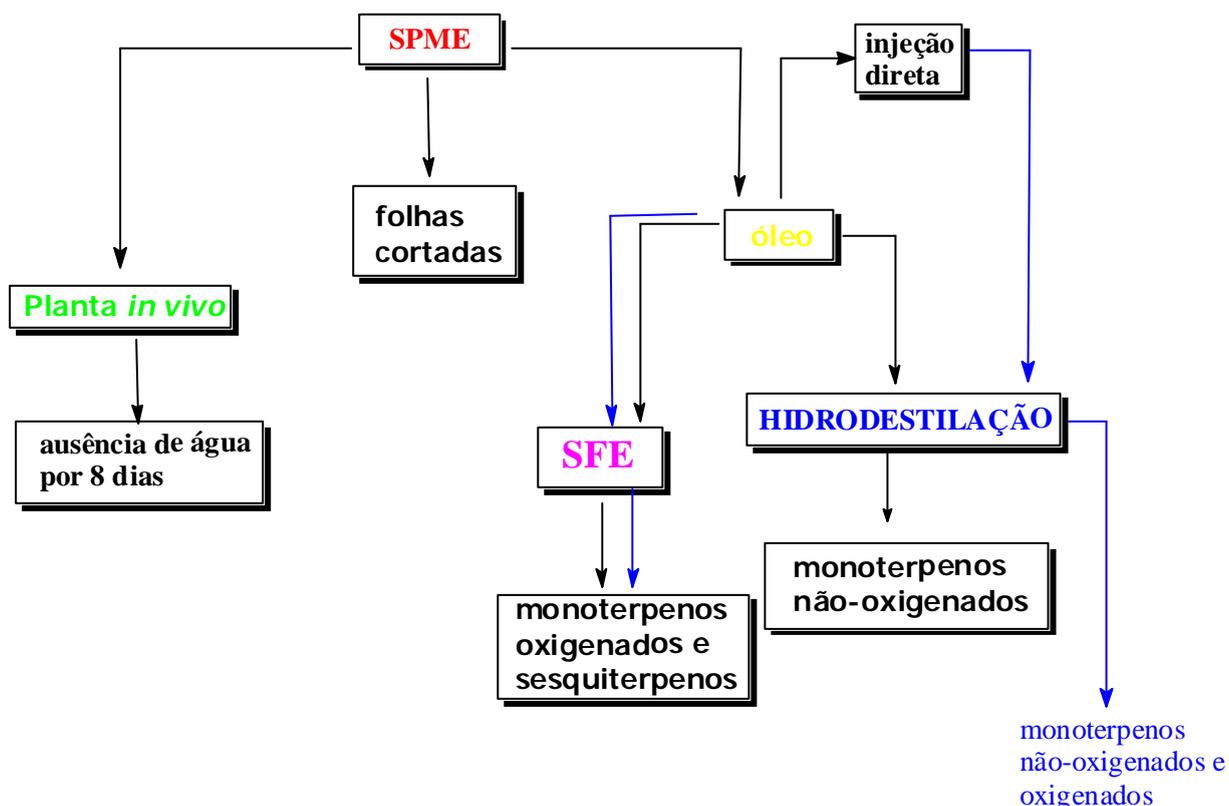
Ao avaliar os cromatogramas das Figuras acima, percebe-se que qualitativamente, a fibra de PDMS absorve preferencialmente os compostos não-oxigenados, confirmando o

que foi discutido no decorrer dessa dissertação. A fibra de CW-DVB apresenta uma afinidade maior pelos compostos oxigenados.

Considerando a situação provocada a esta planta de alecrim, percebe-se que depois de oito dias sem água, ela apresentou uma redução da resposta com relação à fração volátil. Esta observação pode ser reforçada pelos dados obtidos com as duas fibras: PDMS e CW-DVB (cromatogramas acima). Um fato interessante, porém, é que o composto acetato de bornila parece não sofrer muito com a ausência de água, como os demais compostos. A literatura busca interligar certos compostos presentes em plantas, que estejam associados a situações anormais de cultivo como uma maneira da planta se proteger dessa nova situação. Através dos cromatogramas apresentados nas Figuras acima, é possível apenas inferir que a proporção relativa dos compostos presentes na composição volátil da planta de alecrim muda com a ausência de água. Estudos mais detalhados serão objeto de trabalhos futuros.

O presente trabalho permitiu de forma comparativa, avaliar a aplicação da técnica de SPME em amostragem *in vivo* e

O presente trabalho permitiu realizar comparação entre os óleos extraídos por dois diferentes processos de extração (hidrodestilação e fluido supercrítico), com relação a composição volátil da planta *in vivo*, utilizando a técnica de SPME e por análise direta. O quadro abaixo resume de forma esquemática os resultados obtidos.



Com relação ao envelhecimento das folhas de alecrim, a presença dos compostos voláteis apresentou uma variação na concentração, com o tempo, quando analisada pelas fibras de SPME, independente do tipo de revestimento; e algumas diferenças foram observadas quando tais folhas eram extraídas por hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (SFE).

A hidrodestilação mostrou-se mais eficiente na extração de alguns compostos e a SFE, de outros. Isso pelas condições utilizadas no trabalho. A hidrodestilação, por exemplo, para extrair sesquiterpenos, precisa de um tempo superior à 1 hora de extração. A SFE, no entanto, extrai bem tais compostos em menos tempo. Como o interesse deste trabalho era extrair, em maior proporção, os monoterpenos, não foi avaliado um tempo maior nas extrações por hidrodestilação. No tempo de 1 hora houve predominância na extração de monoterpenos, sendo que, analisando os óleos por SPME houve uma preferência pelos não-oxigenados enquanto a análise por injeção direta não demonstrou preferência por nenhuma classe.

As condições de SFE foram otimizadas para extrair, preferencialmente, os monoterpenos oxigenados, exatamente o que ocorreu neste trabalho, tanto analisando os óleos por SPME quanto por injeção direta.

Com relação aos óleos armazenados, as análises indicam que a decomposição ou degradação dos principais componentes do óleo de alecrim ocorre lentamente dentro de um período de seis anos. Claro que seguindo as condições ideais de armazenamento, como ausência de luz, vidros âmbar bem vedados e temperatura controlada.

Já com relação ao comportamento das plantas de alecrim ao ficarem sem água durante oito dias, mostrou que ocorre uma variação dos compostos voláteis significativa dentro desse período. Os compostos que mais variaram foram os monoterpenos oxigenados, com exceção do acetato de bornila. Pode-se inferir que tais compostos estariam associados com a defesa da planta ao ficar sem água por um certo período. Caso houvesse aumento de alguns compostos e diminuição de outros poderíamos sugerir uma provável decomposição, isso não foi observado nos cromatogramas apresentados acima.

5 CONCLUSÕES

A utilização da técnica de SPME na amostragem da fração volátil do óleo essencial do alecrim, seja após a extração das folhas por SFE ou hidrodestilação, seja por sorção direta dos componentes voláteis da planta *in vivo* ou de folhas cortadas, permitiu a extração de mais de 50 compostos.

As análises de SPME, dos óleos de alecrim extraídos por hidrodestilação e SFE, mostraram diferenças na composição volátil quando comparadas às análises das folhas cortadas: a hidrodestilação extraiu uma maior concentração de monoterpenos não-oxigenados enquanto a SFE extraiu uma maior concentração de monoterpenos oxigenados.

Os valores de reprodutibilidade calculados para os terpenos: α -pineno, mirceno, 2-careno, α -terpineno, limoneno, cânfora, linalol, verbenona e geraniol, utilizando a fibra de PDMS e a fibra de CW-DVB, foram semelhantes aos valores encontrados na literatura.

A temperatura de amostragem influencia na concentração relativa dos analitos sorvidos nas fibras. Entre 40 e 50°C, a adsorção dos compostos oxigenados na fibra de CW-DVB é maior que na temperatura de 25°C. Nas temperaturas entre 25 e 40°C, a adsorção dos monoterpenos não-oxigenados na fibra de PDMS é maior. Com relação ao tempo de exposição da fibra, em períodos de 30 e 60 minutos, a fibra de PDMS é mais enriquecida com monoterpenos não-oxigenados, enquanto em tempos de exposição entre 15 e 30 minutos a fibra de CW-DVB é mais enriquecida em monoterpenos oxigenados. Esses comportamentos das fibras foram também evidenciados pela modelagem por PCA.

O estudo, por SPME, do envelhecimento das folhas cortadas de alecrim mostrou, que, após 22 dias, a composição volátil apresentava somente os compostos: α -pineno, canfeno, β -pineno, limoneno/1,8-cineol, cânfora, borneol, verbenona, β - e α -cariofileno. O óleo de alecrim hidrodestilado, após 22 dias do corte das folhas, continha em sua composição volátil: α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, α -terpineno, limoneno/1,8-cineol, γ -terpineno, terpinoleno, cânfora, acetato de bornila, β - e α -cariofileno. O óleo de alecrim extraído por SFE apresentou na composição volátil das folhas cortadas após 22 dias, os compostos: linalol, cânfora, borneol, hidrocarvona, 4-terpineol, verbenona, acetato de bornila, β - e α -cariofileno.

A falta de água por oito dias provocou a redução de componentes voláteis e semi-voláteis nas análises da planta.

Os óleos armazenados por um período de até seis anos não apresentaram alterações significativas no perfil terpênico.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1) Baroni, A. L.; Idina, J. L. B.; Cañigueral, S.; et al.; *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica – Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*; Argentina **2000**, 29-57.
- 2) Moyna, P.; Polígrafo Mini-curso “Quimiotipos”; ABQ-RS, **2001**.
- 3) Simões, C. M. O.; Spitzer V.; *Farmagnosia - Da planta ao medicamento*; Ed. Universidade UFRGS e Ed. UFSC – 2ª Ed., **1999**, ,18, 387.
- 4) Marriot, J.; Shellie, R.; Cornwell, C.; *Journal of Chromatography A* **2001**, 936, 1-22.
- 5) Bottega, S.; Corsi, G.; *Botanical Journal of the Linnean Society* **2000**, 132, 325-335.
- 6) www.biotecnologia.com.br/ acessado em 20/12/2002.
- 7) Zini, C. A, Fábio Augusto; Christensen, E., Smith, B. P., Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4729-4735.
- 8) Alonso J. R.; *Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas*; Ed. Isis Ediciones, **1998**, 845.
- 9) www.hortaemcasa.com.br/produtos/alecrim.htm acessado em 14/03/2002.
- 10)
- 11) www.planetanatural.com.br acessado em 05/02/2003.
- 12) Newall, C.; Anderson, L.; Phillipson, J.; *Herbal Medicines – A Guide for Health-care Professionals*, **1996**, 229-230.
- 13) Koschier, E. H.; Sedy, K. A.; Novak, J.; *Crop Protection* **2002**, 21, 419-425.
- 14) Guillén, M. D.; Cabo, N.; Burillo, J.; *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 70, 359.
- 15) Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Moyna, P. et al.; *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11, 27-30.
- 16) Moyler, D. A.; Browning, R. M.; Stephens, M. A.; *Ten Years of CO₂ Extracted Oils*. In: *Proceedings of the 12th Int. Congress of Flavour, Fragrance and Essential Oils*, Viena, Austria, 59-93.
- 17) Ertl, F.; *Journal of AOAC International* **1997**, 80, (4), 903.
- 18) Cassel, E.; Polígrafo Mini-curso “Processos de Extração de Óleos Essenciais”, ABQ-RS, **2001**.
- 19) Fábio Augusto, Lopes, A L., Zini, C. A; *Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (3).
- 20) Chester, T. L.; Pinkston, J. D.; Raynie, D. E.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 487R-514R.
- 21) Reverchon E.; Della Porta, G.; Senatore, F.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1654.

- 22) Oszagyan, M.; Simandi, B.; Sawinsky, J.; et al.; *Flavour and Fragrance Journal* **1996**, 11, 157-165.
- 23) Tena, M. T.; Valcárcel, M.; Hidalgo, P. J.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 521.
- 24) Taylor, L.; *Supercritical Fluid Extraction*; John Wiley & Sons, Inc., USA, **1996**, cap. 11.
- 25) Camel, V.; *Analyst*, **2001**, 126, 1182-1193.
- 26) Filippis, F. M.; *Dissertação de Mestrado: Extração com CO₂ Supercrítico de Óleos Essenciais de Hon-Sho e Ho-Sho – Experimentos e Modelagem*; Escola de Engenharia, UFRGS; **2001**, 12.
- 27) Bernardo-Gil, M. G.; Ribeiro, M. A.; Esquivel, M. M.; *Boletim de Biotecnologia* (dequim.ist.utl.pt/bbio/73/pdf/fluidos%20supercriticos.pdf), 14-21.
- 28) Hawthorne, S. B.; Riekkola, M. L.; Serenius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Hartonen, K.; *J. of Chromatography A* **1993**, 634, 297-308
- 29) Rozzi, N. L.; Phippen, W.; Simon, J. E.; Singh, R. K.; *Lebensm.-wiss, u-technol.* **2002**, 35, 319-324.
- 30) Fillipis, F. M.; Atti-Santos, A C.; Wada, K.; Atti-Serafini, L.; Vargas, R. M. F., Cassel, E.; *Extraction of Camphor Tree, Rosemary and Lemongrass Essential by CO₂ Supercritical: Experiments and Modeling*; Proceedings 6th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications, **2001**, 169.
- 31) Cassel, E.; Santos, A C.; Frizzo, C. D.; Atti-Serafini, L.; *Efeito do Processo de Extração na Composição do Óleo de Alecrim, EQUIFASE'99*, Vigo-Spain, Tomo II, **1999**, 348-354.
- 32) Gámiz-Gracia, L.; Luque de Castro, M. D.; *Talanta* **2000**, 51, 1179-1185.
- 33) Carlson, L. H. C.; Machado, R. A F.; Spricigo, C. B.; et al.; *Journal of Supercritical Fluids* **2001**, 21, 33-39.
- 34) Pawliszyn, J.; *Solid Phase Microextraction – Theory and Practice*, Wiley-VCH: New York, **1997**, 15;
- 35) *Boletim SUPELCO* 923, **1998**
- 36) Coleman III, W. M.; Lawrence, B. M.; *Flavour and Fragrance Journal* **1997**, 12, 1-8.
- 37) www.supelco.com
- 38) Bicchi, C.; Digo, S.; Rubiolo, P.; *J. of Chromatography A* **2000**, 892, 469-485.
- 39) Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J.; *Analyst* **1999**, 124, 643-649.
- 40) Fábio Augusto, Valente, A L. P.; *Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21 (6+7), 428.
- 41) Zini, C. A.; Zanin, K. D., Christensen, E., et al.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2679-2686.

- 42) Smith, B. P.; Zini, C. A.; Pawliszyn, J.; Tyler, M. J.; Hayasaka, Y.; Williams, B.; Caramão, E. B.; *Chemistry and Ecology* **2000**, 17, 215-225.
- 43) An, M.; Haig, T.; Hatfield, P.; *Journal of Chromatography A* **2001**, 917, 245.
- 44) Boletim SUPELCO 869 A, **1998**.
- 45) Steffen, A.; Pawliszyn, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2187.
- 46) Fábio Augusto, Valente, A. L. P., Tada, E. S.; Rivellino, S. R.; *J. of Chromatography A* **2000**, 873, 117.
- 47) Vereen, D. A.; McCall, J. P.; Butcher, D. J.; *Microchemical Journal* **2000**, 65, 269.
- 48) Zhang, Z.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1843.
- 49) Koziel, J., Jia, M., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5178-5186.
- 50) Langenfeld, J. J.; Hawthorne, S. B.; Miller, D. J.; *Journal of Chromatography A* **1996**, 740, 139-145.
- 51) Bao, M.; Griffini, O.; Burrini, D.; Santianni, D.; Barbieri, K.; Mascini, M.; *Analyst* **1999**, 124, 459-466.
- 52) Fritzs, J. S.; *Analytical Solid Phase Extraction*, Wiley, New York; 161-169.
- 53) Marriott, P. Neto, J. M. M.; Moita, G. C.; *Química Nova* **1998**, 21(4), 467-469.
- 54) Vogt F., Tacke M.; *Chemometrics and Intelligent Lab. Syst.* **2001**, 59, 1-18
- 55) Gran, H.; Szeverenyi, N. M.; Roggenbuck, M. W.; et al.; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1989**, 5, 311-322.
- 56) Geladi, P.; Isaksson, H.; Lindqvist, L.; Wold, S.; Esbensen, K.; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1989**, 5, 209-220.
- 57) Morgano, M. A, Queiroz S. C. N., Ferreira M. M. C.; *Ciência e Tecnol. De Alimentos* **1999**, 19 (3), (versão impressa).
- 58) Silva, F. V.; Kamogawa, M. Y.; Ferreira, M. M. C.; Nóbrega, J. A; Nogueira, A R. A; *Eclat. Quím.* **2002**, 27 (versão impressa).
- 59) Ferreira, M. M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.*; **2002** 13 (6), 742-753.
- 60) Ferreira, M. M. C., Faria C. G., Paes, E. T.; *Chemometrics and Intelligent Lab. Syst.* **1999**, 47, 289-297.
- 61) Ferreira, M. M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13(6), 742-753.
- 62) Cardello, H. M. A, B.; Faria, J. B.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2000**, 20 (1), (versão impressa).
- 63) Zini, C. A; *Estudo dos compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através do uso de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME)*, Tese de Doutorado, UFRGS, **2002**.

- 64) Treves, K.; Shragina, L.; Rudich, Y. *Atmos. Environ.* **2001**, 35, 5843-5854.
- 65) Reverchon, E.; Donsí, G.; Pota, F.; *Ital. J. Food Sci.* **1992**, 3, 187.
- 66) Perry, J. H.; *Chemical Engineer's Handbook*; MacGraw-Hill Book Company, **1963**, 3-47.