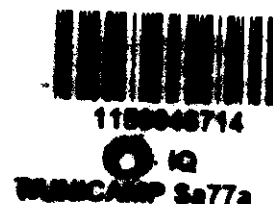


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE
PLANTAS AROMÁTICAS POR
MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ACOPLADA A
CROMATOGRAFIA GASOSA (SPME / CG)**

**Aluno: Adilson Sartoratto
Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto**

Dezembro/2001

UNIDADE	I (C)
Nº CHAMADA	T 10.04.02
	Sa 77a
V	EX
1	48714
2	16-837102
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	
61	
62	
63	
64	
65	
66	
67	
68	
69	
70	
71	
72	
73	
74	
75	
76	
77	
78	
79	
80	
81	
82	
83	
84	
85	
86	
87	
88	
89	
90	
91	
92	
93	
94	
95	
96	
97	
98	
99	
100	



CM00166924-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Sa77a

Sartoratto, Adilson

Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por micro-extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME / CG) / Adilson Sartoratto. -- Campinas, SP: [s.n], 2001.

Orientador: Fábio Augusto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Óleos essenciais. 2. SPME. 3. Compostos orgânicos voláteis biogênicos. I. Augusto, Fábio. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. III. Título.

Aos meus pais
pelo incentivo em todos os momentos,

Ao Victor,
meu grande companheiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) pela oportunidade concedida e uso das instalações,

Ao Professor Dr. Fabio Augusto pela orientação e amizade,

Ao Dr. Pedro Melillo de Magalhães e Dra. Glyn Mara Figueira da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA, pelo fornecimento das plantas estudadas,

Às Doutoradas Vera Lúcia Garcia Rehder e Mary Ann Foglio pelo apoio e amizade,

À Marili Villa Nova Rodrigues pela amizade e ajuda nas discussões para melhoria do trabalho desenvolvido,

À Marta e Alexandre da Divisão de Microbiologia, pela amizade e empréstimo do sistema termostatzado,

À Adriana da Silva Santos pela colaboração durante a realização deste trabalho,

Aos amigos da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, Nelson, Sinésio, Leandro, Amanda, Aline, Michelle, Diogo, que de uma forma ou outra contribuíram para execução deste trabalho,

À FAPESP e FAEP pelo apoio financeiro,

À todos, muito obrigado.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos otimizar uma metodologia para análise de compostos voláteis produzidos por plantas aromáticas e medicinais utilizando Micro-extração em Fase Sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*), e aplicar essa metodologia otimizada a amostras reais.

Os ensaios mostraram que os melhores resultados foram obtidos usando fibra de SPME recoberta com 100 μm de polidimetilsiloxano e os seguintes valores para as principais variáveis operacionais: temperatura da amostra = 55°C, tempo de equilíbrio solução / *headspace* = 30 min, tempo de extração = 20 min e força iônica do meio correspondente a 36% de NaCl (m/v).

Com os parâmetros definidos, o método foi aplicado na caracterização de compostos voláteis produzidos por *Aloysia gratissima* (alfazema do Brasil), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Mentha piperita* var. *citrata* (hortelã), *Mentha spicata* (hortelã vilhoça), *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum applii* (orégano), *Ocimum basilicum* (alfavaca) e *Ocimum gratissimum* (alfavacão).

A metodologia também foi aplicada para a quantificação dos constituintes majoritários de *Cymbopogon martinii*, e os resultados comparados com os resultantes da análise cromatográfica convencional do óleo essencial extraído da mesma amostra por hidrodestilação. Os resultados obtidos indicam que a metodologia pode ser usada para análises de rotina.

ABSTRACT

The objectives of this work were the optimization of a methodology using Solid Phase Microextraction (SPME) for analysis of volatile compounds produced by aromatic plants, and the application of this methodology to real samples.

The experiments showed that the best results were obtained using SPME fibers recovered with 100 μm polydimethylsiloxane and with the following operational parameters: sample temperature = 55°C, sample / headspace equilibration time = 30 min, extraction time = 20 min and sample solution ionic strength at 36 % NaCl.

The method was applied to characterize the chromatographic profiles for the volatile compounds produced by *Aloysia gratissima* (Brazil lavender), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Mentha piperita* var. *citrata* (peppermint), *Mentha spicata* (spearmint), *Origanum vulgare* (oreganum), *Origanum applii* (oreganum), *Ocimum basilicum* (basil) and *Ocimum gratissimum*.

The methodology was also employed for the quantification of the main volatile components of *Cymbopogon martinii*, and the results were compared to the conventional chromatographic analysis of the same sample. It is concluded that the developed SPME methodology may be used in routine analysis.

CURRICULUM VITAE

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adilson Sartoratto

Endereço: Rua Mata da Tijuca, nº 119

Bosque de Barão Geraldo - Barão Geraldo - Campinas/SP

CEP 13083-721

Fone (019) 289-8215

RG - 9.056.278 (SSP-SP) CIC - 042.809.608-52 CRQ - 04221162 (4ª região)

2. FORMAÇÃO

Mestrado (1999-2001)

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

Área de concentração: Química Analítica

Ensino Superior (1983-1987)

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

curso: Química modalidade: Tecnológica

3. TRABALHOS PUBLICADOS

- 3.1. Duarte, M.C.T.; Serzedello, A.; Serra, G.E.; Oliveira, M.C.F.; Ponezi, A.N.; **Sartoratto, A.**, "Effect of lecithin and soy oil on the fermentative performance of *Saccharomyces uvarum* IZ 1904", *Journal of Brazilian Society for Microbiology*, (1996) **27**: 255-262
- 3.2. Pedro Melillo de Magalhães; Nicolas Delabays; **Adilson Sartoratto**; "New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil", *Revista Ciência e Cultura*, (1997), **49** (5/6): 413-415
- 3.3. Marchese, J.A.; Rehder, V.L.G.; **Sartoratto, A.**; "Quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. – Uma comparação entre as técnicas cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, (2001), **4** (1)

- 3.4. Vera Lúcia Garcia Rehder, **Adilson Sartoratto**, "Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (2001)

4. PATENTE

Rehder, V.L.G.; Foglio, M.A.; Nogueira, C.; Boaventura Jr., S.; Rodrigues, R.A.; **Sartoratto, A.** "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ARTEMISININA A PARTIR DE *Artemisia Annu*a L" Protocolo N ° 002722 – 17 de agosto de 1998.

5. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais - 30

6. Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais – 7

ÍNDICE

Abreviações e Símbolos	xii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
2.1. Estudar o efeito de variáveis operacionais relevantes em extrações por SPME para sua aplicação à caracterização de compostos voláteis produzidos por plantas aromáticas	5
2.2. Aplicar a metodologia geral desenvolvida para a identificação e quantificação de compostos voláteis presentes em amostras vegetais	5
3. Aspectos teóricos de SPME (Revisão bibliográfica)	6
3.1. Micro Extração em Fase Sólida	6
3.2. Considerações Cinéticas	9
3.3. Seleção do Modo de Extração	13
3.4. Estudo dos Perfis de Extração	13
3.5. Seleção da Técnica de Extração	14
3.6. Otimização da Dessorção	14
3.7. Validação do Método	14
4. Materiais	19
4.1. Reagentes	19
4.2. Material Vegetal	19
4.3. Outros Materiais	19

4.4. Cromatógrafos	19
5. Resultados e Discussão	20
5.1. Otimização das Condições Operacionais para Aplicação de SPME a Constituintes Voláteis de Plantas Aromáticas	20
5.2. Comparação entre as fibras P100 e CAR	25
5.3. Avaliação dos Parâmetros Quantitativos	29
5.3.1. Reprodutibilidade	29
5.3.2. Linearidade	31
5.4. Identificação dos Constituintes Voláteis	32
5.5. Quantificação dos Constituintes Voláteis Selecionados	42
5.5.1. Quantificação Convencional	42
5.5.2. Quantificação por SPME	42
6. Conclusões	44
7. Referências Bibliográficas	45
8. Anexos	52
8.1. Trabalho a ser apresentado no <i>Seventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography</i> - HTC-7 - (6-8/02/2002)	53
8.2. Artigo a ser submetido ao <i>Journal of Chromatography A</i> , Special Symposium Volume – HTC-7	55
8.3. Trabalho apresentado na 24ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (28-31/05/2001)	73
8.4. Espectros de massa dos analitos não identificados	74

ABREVIATÖES E SÍMBOLOS

- BVOC – Compostos orgânicos biogênicos voláteis (biogenic volatile organic compounds)
- CAR – Carboxen
- CG-DCE - Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons
- CG-DIC – Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
- CG-EM – Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas
- CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por Ultravioleta
- DVB – Divinilbenzeno
- FI – Força iônica
- HS-SPME – Micro extração em fase sólida no *headspace* da amostra
- P100 – Fibra de polidimetilsiloxano 100 µm
- PA – Poliacrilato
- PDMS – polidimetilsiloxano
- MM – Massa molar
- SPME - Micro extração em fase sólida (Solid phase microextraction)
- SPME-CG - Micro extração em fase sólida / Cromatografia gasosa
- SPME-CG-EM-MIU - Micro extração em fase sólida / cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas / monitoramento de íons único
- T – Temperatura
- t_{eq} – Tempo de equilíbrio solução / headspace
- t_{ext} – Tempo de exposição da fibra
- THM – Trialometanos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Dispositivo para SPME. Vista geral em corte (esquerda): 1 - fibra extratora; 2 - agulha de aço; 3 - corpo do aplicador; 4 - septo de silicone; 5 - guia do aplicador; 6 – guia do êmbolo e 7 – êmbolo; e Detalhe da extremidade fibra / agulha (direita): a - fibra extratora; b - tubo capilar de aço e c - agulha (modificado de [3])	2
Figura 2 – Perfis de extração para 1 ppm de benzeno em água, (A) segundo o modelamento da equação 8 (usando-se $K_{fm} = 125$, $D_f = \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e $D_m = 1,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$), sob três condições de agitação: (B) agitação magnética a 2500 rpm, (C) 1800 rpm, (D) 400 rpm e (E) sem agitação	10
Figura 3 – Extração SPME direta com agitação prática. δ = espessura da camada estática (não agitada)	10
Figura 4 – Correlações entre K_{hm} e K_m e os perfis de extração para analitos extraídos num sistema hipotético (adaptada de [25]; detalhes no texto)	12
Figura 5 – Perfis de extração obtidos para SPME de <i>headspace</i> sob agitação, de solução aquosa contendo 1 ppm de benzeno e o-xileno	13
Figura 6 - Microseringa adaptada para uso com SPME: 1- corpo da seringa; 2 - êmbolo; 3 - agulha; 4 - tubo capilar de aço e 5 - fibra extratora (adaptado de [14])	15
Figura 7 - Detalhe da junção fibra / tubo capilar: a - recobrimento da fibra; b - núcleo de sílica e c - tubo capilar de aço (adaptado de [14])	15
Figura 8 - Modificação do dispositivo comercial de SPME para análise de hálito: 1 - tubo de material inerte; 2 - abertura; 3 - fibra extratora e 4 - corpo do dispositivo comercial (modificado de [33])	15

Figura 9 – Superfície de resposta $m \times T \times t_{\text{ext}}$ obtida no planejamento fatorial completo 2^2	24
Figura 10 – Áreas normalizadas para os analitos em função do tempo de extração para a fibra CAR. Analitos: $\square$ = α -pineno; $\circ$ = β -pineno; Δ = limoneno; $\blacksquare$ = geraniol; $\bullet$ = acetato de geranila; $\blacktriangle$ = <i>cis</i> -nerolidol e $\star$ = <i>trans</i> -nerolidol	26
Figura 11 – Áreas normalizadas para os analitos em função do tempo de extração para a fibra P100. Analitos: $\square$ = α -pineno; $\circ$ = β -pineno; Δ = limoneno; $\blacksquare$ = geraniol; $\bullet$ = acetato de geranila; $\blacktriangle$ = <i>cis</i> -nerolidol e $\star$ = <i>trans</i> -nerolidol	26
Figura 12 – Razões entre as áreas absolutas obtidas com as fibras P100 e CAR para α -pineno, β -pineno e limoneno (A) e para geraniol, acetato de geranila, <i>cis</i> -nerolidol e <i>trans</i> -nerolidol (B). Analitos: $\square$ = α -pineno; $\circ$ = β -pineno; Δ = limoneno; $\blacksquare$ = geraniol; $\bullet$ = acetato de geranila; $\blacktriangle$ = <i>cis</i> -nerolidol e $\star$ = <i>trans</i> -nerolidol	27
Figura 13 – Áreas absolutas dos analitos testados para as fibras CAR e P100 ($t_{\text{ext}} = 20$ min.)	28
Figura 14 – Cromatogramas obtidos para extrações da mistura de teste com a fibra P100 (A) e CAR (B) com $t_{\text{ext}} = 50$ min. Fundos de escala diferentes para cada cromatograma	29
Figura 15 – Curva analítica para geraniol	31
Figura 16 – Compostos voláteis de <i>A. gratissima</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 7	34
Figura 17 – Compostos voláteis de <i>C. martinii</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 8	35

Figura 18 – Compostos voláteis de <i>M. X Piperita var. citrata</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 9	36
Figura 19 – Compostos voláteis de <i>M. spicata</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 10	37
Figura 20 – Compostos voláteis de <i>O. vulgare</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 11	38
Figura 21 – Compostos voláteis de <i>O. applii</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 12	39
Figura 22 – Compostos voláteis de <i>O. basilicum</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 13	40
Figura 23 – Compostos voláteis de <i>O. gratissimum</i> (seção do cromatograma). Identificação dos picos: q.v. Tabela 14	41
Figura 24 – Curvas de calibração para geraniol e acetato de geranila – quantificação convencional	42
Figura 25 – Curvas de calibração para geraniol e acetato de geranila – quantificação por SPME	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fibras para SPME comercialmente disponíveis	16
Tabela 2 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} e massas recuperadas <i>m</i> de geraniol	21
Tabela 3 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial completo 2^3 e massas recuperadas <i>m</i> de geraniol	22
Tabela 4 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial completo 2^2 e massas recuperadas <i>m</i> de geraniol	23
Tabela 5 – Estimativas de desvio-padrão relativo s_R em % para áreas de geraniol e acetato de geranila medidas (replicatas por dia = 5)	30
Tabela 6 – Análise de variância dos dados de reprodutibilidade da tabela 5	30
Tabela 7 – Compostos voláteis identificados em <i>A. gratissima</i> após extração com SPME	33
Tabela 8 – Compostos voláteis identificados em <i>C. martinii</i> após extração com SPME	35
Tabela 9 – Compostos voláteis identificados em <i>M. X Piperita</i> var. <i>citrata</i> após extração com SPME	36
Tabela 10 – Compostos voláteis identificados em <i>M. spicata</i> após extração com SPME	37
Tabela 11 – Compostos voláteis identificados em <i>O. vulgare</i> após extração com SPME	38

Tabela 12 – Compostos voláteis identificados em <i>O. applii</i> após extração com SPME	39
Tabela 13 – Compostos voláteis identificados em <i>O. basilicum</i> após extração com SPME	40
Tabela 14 – Compostos voláteis identificados <i>O. gratissimum</i> após extração com SPME	41
Tabela 15 – Teor de geraniol e acetato de geranila em <i>C. martinii</i>	43

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de um método analítico é determinada pela qualidade de suas etapas, com seus erros experimentais. De modo geral essas etapas são: amostragem, preparação das amostras, separação, quantificação, avaliação estatística e decisão. Cada etapa é crítica para obtenção de resultados corretos. Na etapa de amostragem decide-se de que forma a coleta de material deve ser feita para se obter uma quantidade que represente as características do mesmo. Na preparação da amostra os componentes de interesse da matriz são isolados, pois na maioria dos instrumentos analíticos uma análise direta não é possível. Nesta etapa é necessário obter níveis de concentração convenientes para os analitos, por exemplo, antes da determinação de traços de componentes presentes no solo ou na água, é preciso isolá-lo da matriz, concentrá-lo e freqüentemente submetê-lo a um processo de limpeza. Durante a etapa de separação do processo analítico, a mistura contendo o analito de interesse é dividida nos seus constituintes, tipicamente por medidas cromatográficas ou técnicas de eletroforese. A etapa de quantificação permite determinar as quantidades dos compostos identificados, identificação esta, que pode ser realizada pelo tempo de retenção combinado com uma detecção seletiva. A avaliação estatística fornece uma estimativa da concentração do analito alvo na amostra analisada. Finalmente, com os dados obtidos, pode-se decidir qual procedimento a ser adotado para a amostra.

Com relação a etapa de preparação da amostra, o isolamento dos analitos pode ser realizado com ou sem o uso de solventes. Dois processos típicos que utilizam solventes, são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Em ambos, são realizadas várias etapas até obtenção dos analitos. Existem também processos que dispensam o uso de solventes como: extração em fase gasosa (*headspace*), extração em membrana e extração em sorventes (micro-extração em fase sólida).

A Micro-Extração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*) é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra, descrita por Arthur *et al.* [1, 2] no início da década de 90 e que tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais. O seu princípio básico é simples: uma fibra de sílica recoberta com um filme de material sorvente (polímeros ou adsorventes sólidos), é exposta à amostra ou ao seu espaço confinante (*headspace*). Os analitos contidos na amostra ou no *headspace* são sorvidos na camada de recobrimento da fibra; os materiais extraídos podem ser então transferidos da fibra para um instrumento analítico

adequado para a sua separação, identificação e quantificação. Frequentemente, a Cromatografia Gasosa (CG) é a técnica instrumental empregada para as etapas de identificação e quantificação que se seguem à extração por SPME: a fibra pode ser introduzida diretamente no injetor aquecido do cromatógrafo, sendo os analitos coletados dessorvidos termicamente e arrastados pelo fluxo de gás de arraste para a coluna cromatográfica. Pode-se fazer extrações seletivas por escolha adequada do tipo de material de recobrimento da fibra.

O dispositivo básico para SPME (comercializado desde 1993 pela Supelco Inc., Bellefonte, PA – EUA) consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida, com 10 mm de sua extremidade recoberto com um filme fino de polímero (polidimetilsiloxano, poliacrilato ou carbowax) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado = Carboxen). As espessuras dos recobrimentos das fibras comerciais variam de 7 μm a 100 μm e seus volumes de 0,03 μL a 0,7 μL , respectivamente. (Figura 1).

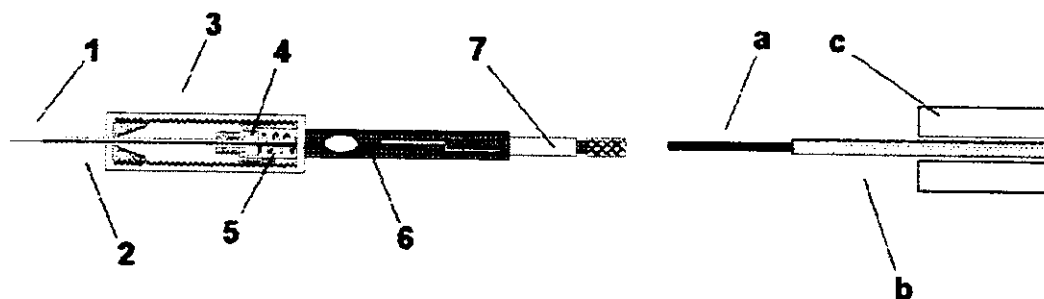


Figura 1 - Dispositivo para SPME. Vista geral em corte (esquerda): 1 - fibra extratora; 2 - agulha de aço; 3 - corpo do aplicador; 4 - septo de silicone; 5 - guia do aplicador; 6 - guia do êmbolo e 7 - êmbolo; e Detalhe da extremidade fibra / agulha (direita): a - fibra extratora; b - tubo capilar de aço e c - agulha (modificado de [3]).

As fibras para SPME para uso com este dispositivo são fornecidas montadas em uma agulha, sendo que este conjunto é rosqueado no aplicador. Desta forma o aplicador é reutilizável, bastando trocar o conjunto (fibra + agulha) quando necessário. Os fundamentos no desenvolvimento de metodologias de SPME - envolvendo otimização de parâmetros como posição da fibra no injetor do CG, temperatura e tempo de dessorção, condições de foco dos analitos na ponta da coluna cromatográfica, tempo e temperatura de extração, velocidade de agitação da amostra líquida durante a extração; pH e força iônica da amostra, dentre outros - já foram abordados na literatura [4].

Em comparação com outras técnicas de preparo de amostra, a SPME apresenta uma série de características interessantes. Ela é mais rápida e operacionalmente mais simples que muitas das técnicas tradicionais; além disso, não exige equipamento analítico especialmente modificado e dedicado a esta finalidade (ao contrário de algumas das outras técnicas, como os métodos de manipulação dinâmica do *headspace* de amostras). O manuseio reduzido das amostras em comparação às técnicas convencionais minimiza a possibilidade de formação de artefatos. Os analitos podem ser extraídos e transferidos diretamente ao cromatógrafo gasoso, sem intervenção de solventes extratores - cujo uso, além de ser uma possível fonte de contaminantes, é um fator complicante no gerenciamento de um laboratório analítico, pela necessidade de adoção de procedimentos de descarte e pelos riscos ocupacionais associados à sua manipulação. Por suas características, a SPME é uma técnica que pode ser facilmente usada para aplicações em campo. As extrações podem ser realizadas *in situ*, e as fibras com os materiais coletados transportadas ao laboratório químico para a continuidade do procedimento analítico. A disponibilidade de cromatógrafos gasosos e microcomputadores portáteis pode permitir a extensão de todo o processo analítico no local de coleta das amostras.

A SPME tem sido aplicada com sucesso a amostras de origem extremamente variada [5]. Dentre estas, o seu uso em diversos procedimentos com amostras de origem vegetal – incluindo isolamento, identificação e quantificação de compostos orgânicos voláteis biogênicos (BVOC, *biogenic volatile organic compounds*), óleos essenciais e contaminantes - têm recebido grande atenção. O uso de SPME na caracterização de monoterpenos produzidos por folhas de pinheiros foi descrito por Schaffer *et al.* [6], que estudaram as principais variáveis operacionais envolvidas e aplicaram o método na determinação dos padrões de composição da mistura de terpenos produzida por quatro diferentes espécies de pinheiros. Coleman *et al.* [7] testaram 4 métodos de extração (amostragem *gas-tight*, *purge & trap*, injeção direta do óleo em solvente orgânico e SPME) na análise do óleo essencial de *Juniperus virginiana*, verificando que na análise quantitativa por SPME, o tempo de amostragem causa impacto significativo na distribuição dos compostos voláteis do óleo. Outro exemplo interessante é o trabalho de Rohloff [8], que através de extrações com SPME e separação e detecção com CG-EM identificou a dependência entre a composição de óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) e seção da folha do vegetal amostrada. O uso de SPME em amostragens *in vivo* de BVOC de vegetais também têm sido proposto; p.ex., Vereen *et al.* [9] coletaram voláteis emitidos por folhas da conífera *Abies fraseri* por extração com fibras de SPME recobertas com 100µm de PDMS (polidimetilsiloxano). An *et al.* [10] utilizaram de SPME acoplada a CG-EM na análise direta do óleo essencial de *Lavandula*

angustifolia com os resultados obtidos comparáveis ao método convencional (extração com solvente orgânico). Recentemente, Bicchi et al. [11], através de uma série extensiva de ensaios, compararam fibras de SPME com recobrimentos variados para a extração de voláteis de quatro plantas aromáticas (*Rosmarinus officinalis* L, *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Valeriana officinalis* L.); os resultados obtidos indicam que os melhores recobrimentos para estas análises são aqueles constituídos por adsorventes (carbono grafitizado = Carboxen ou polidivinilbenzeno = DVB) – dispersos em uma matriz de polímero absorvente (PDMS). Por outro lado, estudos conduzidos por Sandra e colaboradores [12, 13], cobrindo diversas técnicas de extração (SPME, *purge & trapping*, extração com barras magnéticas recobertas com sorvente, etc.) recomendam genericamente PDMS como fase extratora para voláteis produzidos por vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1. Estudar o efeito de variáveis operacionais relevantes em extrações por SPME para sua aplicação à caracterização de compostos voláteis produzidos por plantas aromáticas.

Para estes estudos, foram avaliados os efeitos das principais condições de extração de analitos voláteis típicos em plantas aromáticas por SPME. Como amostras foram empregadas soluções aquosas diluídas desses componentes, e as extrações foram feitas no *headspace* dessas soluções. Fibras recobertas com PDMS puro e com Carboxen disperso em PDMS foram usadas nos diversos ensaios. Avaliaram-se os efeitos sobre a eficiência de extração, do tempo de equilíbrio amostra / *headspace*, tempo de extração, temperatura de extração e força iônica da amostra. A reprodutibilidade e linearidade da metodologia foram determinadas.

2.2. Aplicar a metodologia geral desenvolvida para a identificação e quantificação de compostos voláteis presentes em amostras vegetais.

Os parâmetros de extração otimizados em 2.1. foram adotados em análises de compostos voláteis presentes em diversas amostras de plantas aromáticas. Os picos presentes nos perfis cromatográficos foram identificados, e os compostos mais relevantes destes perfis foram quantificados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Micro-Extração em Fase Sólida

A primeira descrição de extração por SPME, por Arthur e Pawliszyn [14], data de 1990 e usava fibras óticas. O filme de polidimetilsiloxano (PDMS) que recobria as fibras (com propósito de lhes conferir resistência mecânica) atuava como meio extrator. Os trabalhos iniciais demonstraram a potencialidade da técnica; p.ex., Arthur *et al.* [1] conseguiram quantificar hidrocarbonetos aromáticos em soluções aquosas diluídas extraíndo-os por SPME (fibras óticas cobertas com 56 μm de PDMS), separando-os e quantificando-os por CG com limites de detecção de até 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e desvios-padrão relativos de até 6 % entre replicatas. Também determinaram os parâmetros essenciais que devem ser estudados no desenvolvimento de metodologias de SPME [2, 15]: posição da fibra no injetor do CG, temperatura e tempo de dessorção; condições de foco dos analitos na ponta da coluna cromatográfica; tempo e temperatura de extração; velocidade de agitação da amostra líquida durante a extração; pH e força iônica da solução, dentre outros.

O caráter apolar do recobrimento de PDMS das fibras óticas usadas inicialmente limitava as aplicações a analitos apolares, como hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos halogenados e bifenilas policloradas. No primeiro ensaio descrevendo uma extração seletiva com fibras recobertas com outros materiais, Buchholz e Pawliszyn [16] quantificaram fenóis em solução aquosa usando fibras de sílica recobertas com 95 μm de poliacrilato para a extração seletiva, e CG-EM (Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas) para sua separação e identificação, com limites de detecção de até 4 ng.L^{-1} (para o-nitrofenol e p-cloro-m-metilfenol).

Os modelos teóricos da SPME baseiam-se nas relações de equilíbrio dos processos envolvidos. Na forma de extração mais simples - imersão direta de uma fibra recoberta por um filme de polímero na solução-amostra perfeitamente agitada - a massa n de um analito extraído, quando do equilíbrio entre as concentrações de analito na amostra após o equilíbrio, C_a , e na fibra, C_f ($C_a = C_f$), é dada por [17]:

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_0}{(K_{fs} \cdot V_f) + V_s} \quad (\text{Equação 1})$$

onde V_f e V_s são os volumes do recobrimento polimérico da fibra e de solução de amostra, K_{fs} o coeficiente de partição do analito entre a matriz e o recobrimento polimérico da fibra, e C_0 a concentração inicial do analito na matriz. Como o volume do recobrimento é muito pequeno em relação ao volume de amostra, $V_s \gg (K_{fs} \cdot V_f)$, a Equação 1 pode ser reduzida a

$$n \approx K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \quad (\text{Equação 2})$$

Assim, a quantidade de analito extraído é uma função linear da concentração inicial do analito na amostra, C_0 . De acordo com essa equação, a massa extraída aumenta com o volume de recobrimento da fibra, que é função da espessura do filme: uso de filmes espessos resultaria em aumento de sensibilidade. Como o tempo para o sistema atingir o equilíbrio é incrementado com o aumento da espessura do filme, esse parâmetro é limitado na prática a cerca de 100 μm - nos quais pode-se atingir o equilíbrio em até 1 min de exposição da fibra à amostra [18]. O coeficiente de partição K_{fs} é característico para cada par analito/material de recobrimento. Pela seleção adequada da natureza do recobrimento da fibra este coeficiente é variado, e por conseguinte, muda-se a eficiência de extração. Além disso, em amostras complexas, são possíveis extrações seletivas por emprego de fibras com recobrimentos variados.

Para extrações por exposição da fibra ao *headspace* de amostras líquidas, ocorrem simultaneamente equilíbrios entre as concentrações do analito na amostra e no *headspace*, C_{hs} ($C_a = C_{hs}$) e entre as concentrações no *headspace* e na fibra ($C_{hs} = C_f$). Neste caso, a relação entre concentração do analito e massa extraída é [19]:

$$n = \frac{K_{sg} \cdot K_{gf} \cdot V_f \cdot V_s \cdot V_g \cdot C_0}{(K_{sg} \cdot K_{gf} \cdot V_f) + (K_{sg} \cdot V_g) + V_s} \quad (\text{Equação 3})$$

sendo V_g o volume do *headspace*, K_{sg} o coeficiente de partição do analito entre a matriz e o *headspace* e K_{gf} o coeficiente de partição do analito entre o *headspace* e o material polimérico de recobrimento da fibra; os demais termos são definidos como na Equação 1.

A quantificação de analitos em fase gasosa por SPME pode ser simplificada por uma particularidade desta técnica. O equilíbrio entre as concentrações na fibra e na fase gasosa $C_g = C_f$ é governado pelo coeficiente de partição K_{gf} [17]:

$$\frac{C_f}{C_g} = K_{gf} \Rightarrow C_g = \frac{C_f}{K_{gf}} = \frac{n}{V_f} \cdot \frac{1}{K_{gf}} \quad (\text{Equação 4})$$

O volume do recobrimento da fibra depende da sua geometria; a massa de analito absorvida pode ser estimada através da área do pico cromatográfico e do fator de resposta do detetor empregado para o analito. O coeficiente de partição pode ser determinado a partir de misturas gasosas com concentrações conhecidas dos analitos. Alternativamente, sendo os processos de partição na extração por SPME e na eluição em Cromatografia Gasosa análogos, o coeficiente de partição pode ser calculado a partir da retenção do analito em uma coluna de fase estacionária similar ao recobrimento da fibra [20]. A relação entre o tempo de retenção isotérmico de um analito, t_R e o coeficiente de partição é

$$K_{gf} = (t_R - t_M) \cdot \left[F \cdot \left(\frac{T}{T_m} \right) \cdot \left(\frac{p_m - p_w}{p_m} \right) \right] \cdot \frac{3}{2} \cdot \left[\frac{\left(\frac{p_i}{p_o} \right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_o} \right)^3 - 1} \right] \cdot \frac{1}{V_L} \quad (\text{Equação 5})$$

onde t_M é o tempo de retenção do composto não-retido ("tempo morto"), F a vazão da coluna medida com um fluxímetro de filme, T a temperatura da coluna, T_m e p_m respectivamente a temperatura e a pressão ambiente, p_i e p_o as pressões na cabeça e na saída da coluna e V_L o volume de fase estacionária contido na coluna. Entretanto, é mais conveniente calcular o coeficiente de partição a partir do Índice de Retenção Modificado para Programação Linear de Temperatura [21], I_m , dado por

$$I_m = 100 \cdot \left(\frac{t_{R(A)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(A)}} \right) + 100 \cdot n \quad (\text{Equação 6})$$

onde $t_{R(A)}$ é o tempo de retenção do analito e $t_{R(n)}$ e $t_{R(n+1)}$ são os tempos de retenção de n -alcanos respectivamente com n e $(n+1)$ carbonos em sua cadeia, sendo $t_{R(A)} > t_{R(n)}$ e $t_{R(A)} < t_{R(n+1)}$. A relação entre I_m e K_{gf} é logarítmica:

$$\log(K_{gf}) = a + b \cdot I_m \quad (\text{Equação 7})$$

sendo $a = \Delta H^v/(2,303R)$ e $b = [\log(RT/\gamma p^*) - \Delta H^v/(2,303RT^*)]$ (ΔH^v = calor de vaporização do analito, R = constante universal dos gases, T = temperatura, γ = coeficiente de atividade do analito e p^* = pressão de vapor do analito à uma temperatura T^*).

Usando as relações acima, determinados o coeficiente de partição e o fator de resposta do detector para um determinado analito pode-se quantificá-lo em fase gasosa diretamente a partir da área do pico cromatográfico, sem a necessidade de construção de curvas de calibração individuais para cada análise. Martos *et al.* [21] usaram quantificação por SPME baseada em índices de retenção para determinação da concentração total de hidrocarbonetos de petróleo em ar, obtendo resultados comparáveis aos de um método envolvendo calibração convencional - $(262 \pm 13) \mu\text{g.L}^{-1}$ contra $(257 \pm 10) \mu\text{g.L}^{-1}$. Quantificação por SPME baseada em índices de retenção também foi aplicada na determinação de estireno em ambientes industriais [22].

3.2. Considerações Cinéticas

A equação 8 expressa o tempo para atingir o equilíbrio, t_e , em função da espessura do recobrimento (L_f) e do coeficiente de difusão do soluto nessa camada (D_f).

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_f^2}{D_f} \quad (\text{Equação 8})$$

Segundo esta equação, o tempo necessário para atingir o equilíbrio seria infinito, mas, devido às incertezas experimentais inerentes às extrações por SPME, considera-se, como mostrado na equação 8, um tempo de equilíbrio prático (t_{95}), que corresponde a extração de 95% da massa que seria extraída após um tempo infinito de extração.

A correlação do modelamento pela equação 8 com a situação experimental precisa ser avaliada com cautela. Por exemplo, quando nela são substituídos os parâmetros para a fibra com o recobrimento mais espesso comercialmente disponível (PDMS, $L_f = 100 \mu\text{m}$) e um analito como benzeno, de $D_f = 2,8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ é previsto que t_{95} seria cerca de 20 segundos [23]. Na prática, este valor só é aproximado quando a extração do benzeno é feita de uma matriz gasosa [15]. Em extrações de matrizes aquosas, o tempo necessário ao trânsito do analito pela matriz até atingir a superfície da fibra teria de ser considerado; neste caso o t_e é de 200 segundos ou mais [23]. (figura 2)

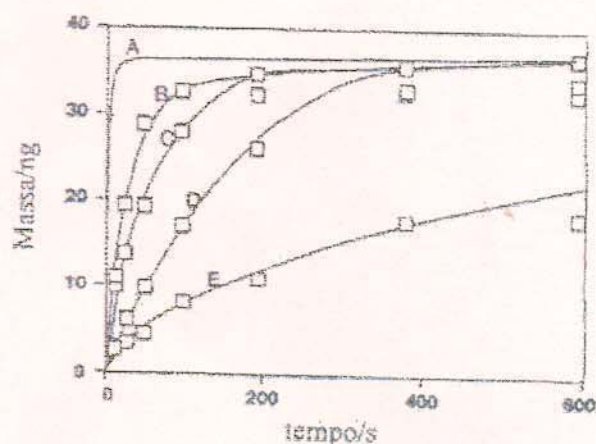


Figura 2 – Perfis de extração para 1 ppm de benzeno em água, (A) segundo o modelamento da equação 8 (usando-se $K_{fm} = 125$, $D_f = \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e $D_m = 1,08 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$), sob três condições de agitação: (B) agitação magnética a 2500 rpm, (C) 1800 rpm, (D) 400 rpm e (E) sem agitação. —

Na figura 2 são mostrados 5 perfis de extração (curvas relacionando fração extraída com tempo de extração), do benzeno com a fibra PDMS. A curva A é teórica e representa o comportamento segundo a equação 8; as demais curvas são experimentais, com vários níveis de agitação da matriz aquosa (curvas B, C e D) e sem agitação (curva E). Comparando-se as curvas experimentais nota-se que o t_e diminui com o aumento da agitação da matriz, porque este procedimento facilita o contato do analito com a fibra. No entanto, mesmo sob agitação, o t_e é substancialmente maior do que o previsto pela equação 8. Isto ocorre porque apesar da agitação, a superfície da fibra fica em contato com uma camada estática da matriz, de espessura δ , onde não existe agitação. (figura 3)

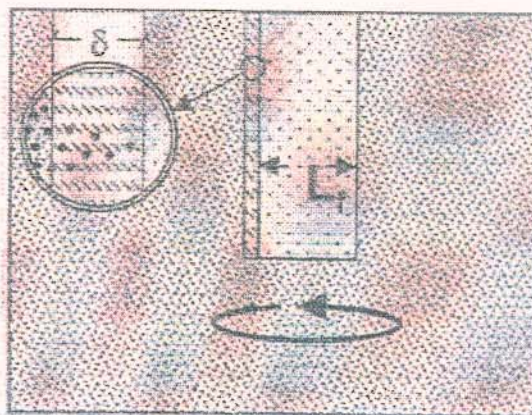


Figura 3 – Extração SPME direta com agitação prática. δ = espessura da camada estática (não agitada).

Ao contrário do que ocorre na região agitada, na camada estática, a transferência de massa ocorre exclusivamente por difusão e, portanto, é mais lenta. Na equação 9, o produto $\delta K_{fm} L_f$ relaciona os fatores responsáveis pelo retardamento de t_e , pois o tempo de equilíbrio é incrementado com o aumento da camada estática, da espessura do recobrimento da fibra e de K_{fm} , que dimensiona a quantidade de analito necessária para ser atingida a concentração de equilíbrio na fibra [24]. A equação 9 aplicada à extração de benzeno da água resulta num valor previsto para t_e de 190 segundos [25], próximo dos resultados mostrados na figura 3.

$$t_e \approx t_{95} = \frac{3\delta K_{fm} L_f}{D_m} \quad (\text{Equação 9})$$

A equação 9 tem implicações experimentais importantes na extração direta com agitação. Uma delas é a de que o tempo para atingir o equilíbrio é mais dependente da difusão do soluto na camada aquosa estacionária (D_m) do que na fibra. Além disso, fibras com recobrimentos menos espessos são convenientes para extrações mais rápidas (deve-se considerar porém, que com recobrimentos finos, a quantidade de material extraído é menor, o que pode limitar a sensibilidade analítica).

A discussões anteriores enfocaram os fundamentos da SPME direta em matrizes aquosas e gasosas. A SPME também pode ser usada para extração do *headspace*, como discutido a seguir. Nestas extrações a transferência de massa num sistema trifásico *fibra-headspace-matriz* depende dos equilíbrios de partição entre as 3 fases, das dimensões das fases e dos coeficientes de difusão do soluto nelas. A correlação entre estes fatores e o tempo de equilíbrio, válida para extrações sem agitação é descrita na equação 10:

$$t_e \approx t_{95} = 1,8 \left(\frac{L_h}{K_{hm} D_h} + \frac{L_m}{1,6 D_m} \right) K_{fm} L_f \quad (\text{Equação 10})$$

De acordo com esta equação, é conveniente minimizar as espessuras da matriz (L_m), do *headspace* (L_h) e da fibra (L_f). As limitações para diminuir L_f foram comentadas anteriormente, uma excessiva diminuição de L_m também pode comprometer a sensibilidade do método e as diminuições de L_m e L_h podem afetar negativamente a termodinâmica da extração, caso as concentrações do analito variem excessivamente no *headspace* e na

matriz. Outros aspectos práticos prendem-se aos coeficientes de difusão e às constantes de equilíbrio de partição. Problemas com coeficientes de difusão desfavoráveis podem ser contornados com agitação e/ou aquecimento do sistema. Quanto às constantes de distribuição, o compromisso entre elas pode ser explorado com base na figura 4.

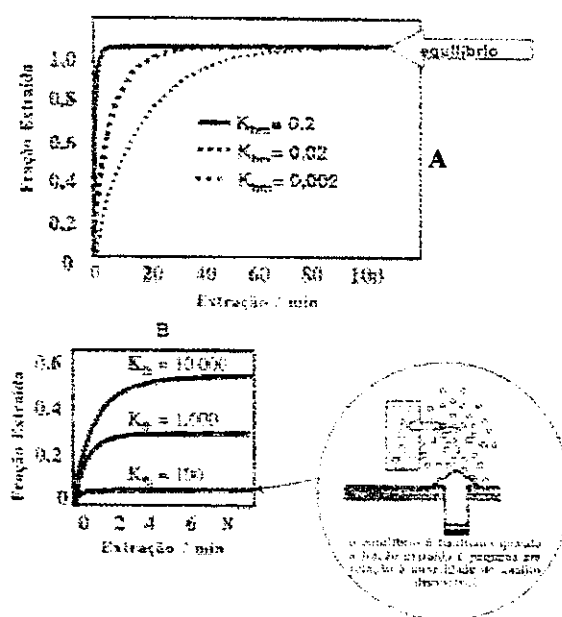


Figura 4 – Correlações entre K_{hm} e K_{fm} e os perfis de extração para analitos extraídos num sistema hipotético (adaptada de [26]; detalhes no texto)

Na figura 4A estão representados, para analitos com $K_{fm} = 10.000$, os perfis de extração para $K_{hm} = 0,2$, $K_{hm} = 0,02$ e $K_{hm} = 0,002$ [26]. Nota-se que o equilíbrio é atingido muito mais rapidamente para o maior valor de K_{hm} . Por outro lado, na figura 4B, em que estão representados perfis de extração para $K_{hm} = 0,2$ e $K_{fm} = 100$, 1.000 e 10.000 , fica evidente que o equilíbrio é atingido mais rapidamente para o menor valor de K_{fm} . Portanto, conforme o destaque na figura 4B, conclui-se que a extração é favorecida para analitos que tenham, simultaneamente, K_{hm} elevado e K_{fm} baixo, pois a concentração de analito na fibra é pequena em relação à sua concentração na amostra [27], o que acontece na prática, pois os volumes dos recobrimentos das fibras são muito menores que os da amostra e do *headspace*.

Um exemplo interessante do efeito do valor de K_{fm} é apresentado na figura 5, em que são mostrados os perfis de extração do *headspace* para benzeno e o-xileno. Na figura, o tempo de extração do benzeno é de aproximadamente 20 segundos, enquanto para o o-

xileno, de 100 segundos. Eles tem, respectivamente, pontos de ebulição de 80°C e 144°C. A maior volatilidade do benzeno torna mais fácil a sua passagem para o *headspace*. Entretanto, a quantidade de benzeno extraída no equilíbrio é menor ($K_m = 301$ para o benzeno, $K_m = 2900$ para o o-xileno) [13].

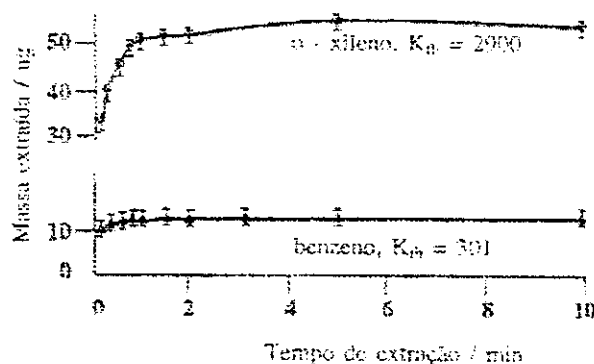


Figura 5 – Perfis de extração obtidos para SPME de *headspace* sob agitação, de solução aquosa contendo 1 ppm de benzeno e o-xileno

3.3. Seleção do modo de extração

As opções são a SPME direta e *headspace*. O fato da SPME direta não ser aplicável a matrizes aquosas contendo particulados e a matrizes sólidas evita trabalhos infrutíferos. Na extração de humuleno e cariofileno de lúpulo, a opção natural foi a extração do *headspace* [28]. Para matrizes aquosas “limpas” ambas alternativas podem ser usadas. Um critério geral é o de que a SPME de *headspace* é indicada para analitos de média e alta volatilidade. No entanto, numa análise de compostos orgânicos voláteis em água, a SPME direta (fibra PDMS 100 μm) foi a melhor opção [29].

3.4. Estudo dos perfis de extração

Estabelecer os perfis de extração é uma forma segura de avaliar os procedimentos para otimização do tempo de extração. Entre os fatores passíveis de estudo estão a espessura da fibra e sua afinidade com os analitos, a agitação do sistema (figura 2), a sua temperatura e o tipo de frasco utilizado (volume, formato e material). Comparar os perfis de extração de analitos diferentes, mostra qual o tempo mínimo para extrações simultâneas numa amostra e quais as sensibilidades relativas entre os correspondentes analitos (figura 5).

3.5. Seleção da técnica de agitação

Como apresentado na figura 2, a otimização da agitação é fundamental para abreviar o tempo de extração. A agitação magnética, por sua simplicidade, é a mais utilizada. Outras técnicas demandam dispositivos mais complexos: vibração da fibra, usada em injetor automático desenvolvido pela Varian, movimentação circular do frasco [30], e sonicação, que diminui o tempo de equilíbrio mas pode adulterar a amostra [30, 31, 32].

3.6. Otimização da dessorção

A dessorção é otimizada com:

- a fibra colocada no centro da zona aquecida do injetor,
- arraste rápido dos compostos dessorvidos da fibra, o que é conseguido usando-se no injetor um “*liner*” de pequeno diâmetro interno (geralmente 0,8 mm nos *liners* comerciais). Com a fibra inserida no *liner* é criada uma região de restrição, onde a velocidade do gás de arraste é aumentada sem necessidade de alterar a sua pressão.
- O injetor em temperatura que seja um compromisso entre a permitida pela fibra e a volatilidade dos analitos.

3.7. Validação do método

As estratégias gerais para validação de um método dependem, entre outros fatores, dos propósitos analíticos e da instrumentação disponível. Ela pode envolver: estabelecimento de linearidade, recuperação (fração extraída dos analitos) e repetibilidade; comparação com métodos convencionais; avaliações com amostras padrão e comparações inter-laboratoriais e com resultados de análises por instituições independentes. Um procedimento importante da convalidação de um método SPME é aplicá-lo, assim como o método convencional a amostras reais, comparando os resultados.

Nos primeiros trabalhos com SPME, as fibras eram montadas em microseringas convencionais modificadas (Figuras 6 e 7) - um pedaço de fibra ótica era preso a um tubo capilar de aço, que por sua vez era adaptado à ponta do êmbolo da microseringa [14]. Com o movimento do êmbolo da microseringa, a fibra podia ser recolhida no interior da agulha ou exposta para extração ou dessorção.

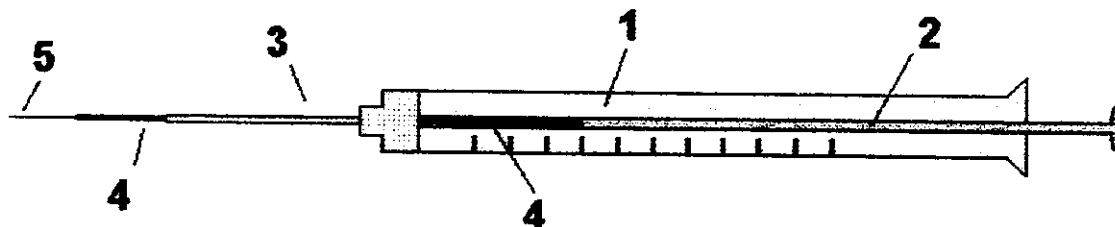


Figura 6 - Microseringa adaptada para uso com SPME: 1- corpo da seringa; 2- êmbolo; 3 - agulha; 4 - tubo capilar de aço e 5 - fibra extratora (adaptado de [14]).

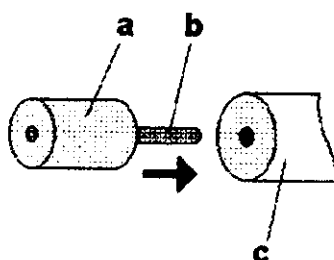


Figura 7 - Detalhe da junção fibra / tubo capilar: a - recobrimento da fibra; b - núcleo de sílica e c - tubo capilar de aço (adaptado de [14]).

Esse arranjo é adequado para a maior parte dos trabalhos de rotina, e o único dispositivo comercial para SPME no mercado, comercializado pela Supelco Inc. (Bellefont, PA - EUA) - figura 1 – foi baseado neste modelo.

Modificações nos arranjos básicos tem sido propostas visando aplicações específicas. Grote e Pawliszyn [33] alteraram o dispositivo comercial para extração de orgânicos voláteis de hálito para análises clínicas (Figura 8), tendo quantificado analitos como acetona ($38 \pm 1,1 \text{ nMol.L}^{-1}$) e isopreno ($10 \pm 1,4 \text{ nMol.L}^{-1}$) nessas amostras.

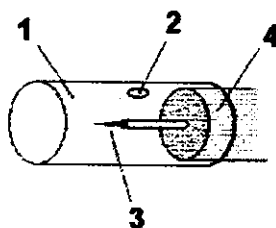


Figura 8 - Modificação do dispositivo comercial de SPME para análise de hálito: 1 - tubo de material inerte; 2 - abertura; 3 - fibra extratora e 4 - corpo do dispositivo comercial (adaptado de [33]).

Zhang e Pawliszyn [34] descrevem um dispositivo para SPME específico para extrações de *headspace* estático similar ao mostrado na Figura 6, mas adaptando a fibra em uma seringa *gas tight* de 500 μL .

Atualmente existem diversos tipos de recobrimento da fibra (tabela 1), todos comercializados pela Supelco.

Tabela 1 – Fibras para SPME comercialmente disponíveis

Fase estacionária e espessura do filme	Abreviação	Aplicação geral (tipo de analito)
Polidimetilsiloxano (100 μm)	PDMS	Não polar, volátil
Polidimetilsiloxano (30 μm)	PDMS	Não polar, volátil e semi-volátil
Polidimetilsiloxano (7 μm)	PDMS	Não polar, semi-volátil e não volátil
Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (65 μm)	PDMS-DVB	Polar
Poliacrilato (85 μm)	PA	Polar, uso geral
Carboxen-polidimetilsiloxano (75 μm , 85 μm)	CAR- PDMS	Volátil, gasosos e análise de traços
Carbowax-divinilbenzeno (65 μm , 75 μm)	CW-DVB	Polar, volátil (limite de temperatura baixo)
Carbowax-templated resin (50 μm)	CW-TPR	Polar, HPLC
Divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (50/30 μm)	DVB-CAR- PDMS	Faixa de polaridade larga (C_3 à C_{20})

Em levantamento realizado por Alpendurada [35], os artigos onde a técnica de SPME é utilizada tem a seguinte distribuição: 40% relacionados a aplicações ambientais, 20% aplicações botânicas e análise de alimentos, 20% análises forenses e clínicas, 15% desenvolvimentos da técnica e 5% artigos de informação geral. Dentre estes podemos destacar Xiao *et al.* [36], que estudaram o uso de fulereno como novo material de recobrimento da fibra usada em SPME. O polímero foi testado na extração de BTEX, naftaleno e diésteres de ácido ftálico no *headspace* de amostras de água, apresentando limites de detecção na faixa de ng/L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtido por CG-DIC.

Peñalver *et al.* [37] avaliaram possíveis alterações na quantidade extraída de 5 pesticidas pela fibra de poliacrilato 85 μm , pela estocagem desta fibra após a extração (0 a 900 min.) e pela adição de padrão interno. Constataram que a adição de padrão interno não alterou a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados, e com exceção de 1 pesticida, o tempo de estocagem não teve efeito significativo sobre a adsorção/dessorção dos analitos. Ábalos *et al.* [38] testaram 5 tipos de fibra na extração de ácidos graxos voláteis, obtendo êxito apenas com a fibra de Carboxen na extração dos ácidos de cadeia curta (acético e propiônico).

Takátz e Torkos [39] utilizaram técnicas como SPME, extração por fluido supercrítico e dessorção térmica, na determinação de clorobenzenos em água e solo, verificando que a SPME apresentou os melhores índices de recuperação (próximos de 100% para todos os analitos) entre as técnicas. Lambropoulou e Albanis [40] analisaram 7 inseticidas organofosforados em amostras de solo, mar, rios e lagos por HS-SPME, obtendo limites de detecção entre 0,01 e 0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e desvios padrão relativos menores que 17%, mostrando a confiabilidade na precisão do método.

Field *et al.* [41] compararam HS-SPME, destilação convencional com pentano e *headspace* direto com seringa *gas-tight*, na determinação dos sesquiterpenos isômeros humuleno e cariofileno em óleo essencial de lúpulo. A SPME apresentou resultados comparáveis as demais técnicas, porém com vantagens em fatores como pequena quantidade de amostra, maior sensibilidade, inexistência de *clean-up* e baixo custo.

Na área ambiental podemos destacar os trabalhos de Doong e Liao [42], que utilizaram HS-SPME para determinar pesticidas organoclorados em amostras de solo utilizando fibras de PDMS e PDMS-DVB, com resultados comparáveis aos obtidos por extração em Soxhlet. Vilchez *et al.* [43] analisaram o inseticida fipronil em amostras de água, solo e urina, utilizando SPME-CG-EM-SIM e fibra de poliacrilato, alcançando limite de detecção de 0,08 ng.mL^{-1} .

Valente *et al.* [44] utilizaram HS-SPME-CG-DCE na quantificação de trihalometanos (THM) em amostras de água potável de 3 localidades do Estado de São Paulo, chegando a resultados que mostram que a técnica pode ser usada como ferramenta para cumprimento da portaria 36/GM do Ministério da Saúde, que determina a monitoração dos THM.

SPME tem sido largamente aplicada a análise de alimentos, onde a utilização da técnica por Kovacevic e Kac [45] permitiu o estudo da composição do óleo essencial de lúpulo, possibilitando a diferenciação entre espécies da matriz, de forma simples e rápida. Pozo-Bayón *et al.* [46] utilizaram uma fibra de PDMS 100 μm no estudo de compostos voláteis de 16 variedades de vinho, o que possibilitou classificar as amostras segundo seus componentes principais, separando-os por variedade dos vinhos e ano de produção.

Elmore *et al.* [47] analisaram os componentes voláteis do aroma de carne de porco fazendo uso de 2 fibras (CAR-PDMS e DVB-CAR-PDMS) simultaneamente. Após a extração as fibras foram dessorvidas sequencialmente no cromatógrafo, possibilitando pela primeira vez, a identificação de 36 componentes do aroma. Os componentes voláteis (principalmente álcoois, ésteres e acetatos) do whiskey foram identificados e quantificados por HS-SPME-CG-EM, utilizando uma fibra de PA 85 μm [48]. Keszler e Héberger [49] utilizaram HS-SPME para identificar componentes voláteis do óleo de girassol, atestando a qualidade do óleo através dos resultados observados.

Componentes voláteis de frutas também foram analisados por SPME; Wan *et al.* [50] utilizaram HS-SPME-CG-EM na análise qualitativa e quantitativa de Kiwi, enquanto Augusto *et al.* [51], avaliaram qualitativamente aromas de 4 frutas brasileiras (cupuassú, cajá, siriguela e graviola), utilizando vários tipos de recobrimento, sendo que a fibra CAR mostrou-se a mais eficiente para extração de analitos leves, enquanto PDMS e PA forneceram informações sobre os analitos de alto peso molecular.

As análises clínicas também se utilizam da técnica de SPME. Koster *et al.* [52] realizaram estudos para determinação de lidocaína em urina através de SPME direta e detecção em CG-DIC e CLAE-UV. O método foi validado, obtendo-se um limite de detecção 5 vezes maior para SPME-CG (5 mg.mL^{-1}) do que para SPME-CLAE (25 mg.mL^{-1}). Snow [53] fez uso de SPME para analisar drogas e seus metabólitos em amostras de água, urina, sangue, saliva e cabelo, apresentando baixos limites de detecção e excelente quantificação.

Queiroz *et al.* [54] realizaram estudos sobre diversas técnicas de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos, constatando que SPME pode ser usada para análises de entorpecentes e antidepressivos. Solventes como ciclohexano e tolueno foram detectados em amostras de ketoprofen (matéria-prima e cápsulas) através de HS-SPME-CG-EM [55].

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes. Todos os reagentes orgânicos (α -pineno, β -pineno, limoneno, geraniol, acetato de geranila, *cis*-nerolidol e *trans*-nerolidol) empregados tinham pureza igual ou superior a 98% (Sigma, St.Louis, MI – EUA ou Aldrich, Milwaukee, WI – EUA). As soluções foram preparadas com água deionizada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA – EUA).

4.2. Material vegetal. Amostras de folhas de *Aloysia gratissima* (Alfazema do Brasil), *Cymbopogon martinii* (Palmarosa), *Mentha X Piperita* var. *citrate* (Hortelã), *Mentha spicata* (Hortelã Vilhoça), *Origanum vulgare* (Orégano), *Origanum X applii* (Orégano), *Ocimum basilicum* (Alfavaca) e *Ocimum gratissimum* (Alfavacão), foram coletadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp, em Campinas – SP.

4.3. Outros Materiais. Foram utilizadas fibras recobertas com 100 μ m de PDMS (P100) e 75 μ m de Carboxen / PDMS (CAR), conectadas a um aplicador manual para SPME (*sample holder*) 57330-U (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Para as extrações, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 25 mL lacrados com septos de teflon/silicone e anéis de alumínio (Pierce, Rockford, IL - EUA) e contendo barras para agitação magnética.

4.4. Cromatógrafos:

4.4.A. As análises para otimização dos parâmetros de SPME e quantificação dos principais constituintes das amostras foram realizadas em cromatógrafo a gás HP-5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA - EUA) com detetor por ionização em chama, injetor split/splitless e equipado com coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As temperaturas de operação foram: injetor = 220°C, detetor = 250°C e coluna = 2 min @ 80°C $\rightarrow$ 3°C.min⁻¹ até 120°C $\rightarrow$ 10°C.min⁻¹ até 200°C $\rightarrow$ 7 min @ 200°C. As injeções foram feitas em modo *splitless*, usando He superseco (1,0 mL.min⁻¹) como gás de arraste.

4.4.B. As análises para identificação dos constituintes voláteis de plantas foram realizadas em cromatógrafo a gás HP5890-II (Hewlett-Packard) com detetor de massas HP-5971 e coluna capilar HP-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m). Temperaturas: injetor = 220°C, detetor = 280°C e coluna = 60°C $\rightarrow$ 3°C.min⁻¹ até 240°C $\rightarrow$ 7 min @ 240°C. O injetor foi mantido em modo *splitless* durante a dessorção dos analitos da fibra de SPME e He superseco (1,0 mL.min⁻¹) foi usado como gás de arraste. Parâmetros do detetor de massas: temperatura da interface - 220°C, faixa de massa – 30-550 u.m.a., fonte de íons - 70 eV.

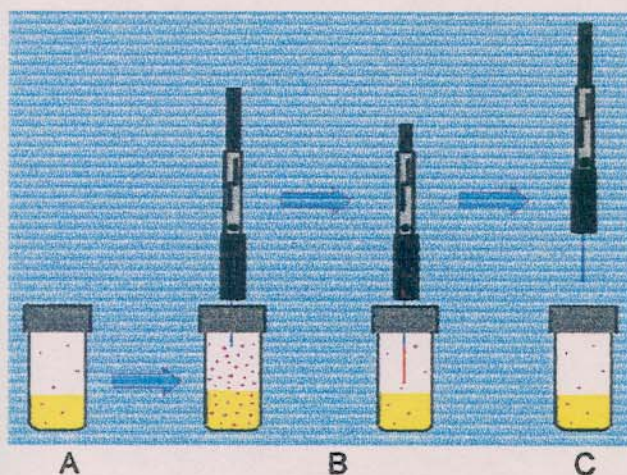
5. Resultados e Discussão

5.1. Otimização das Condições Operacionais para Aplicação de SPME a Constituintes Voláteis de Plantas Aromáticas.

Através de ensaios conduzidos de acordo com a sistemática de planejamento fatorial [56], foi feita a otimização dos principais parâmetros operacionais para extrações por SPME no *headspace* de soluções aquosas de um constituinte típico de plantas aromáticas (geraniol). As variáveis estudadas foram a temperatura de extração (T), o tempo de equilíbrio solução / *headspace* (t_{eq}), o tempo de exposição da fibra ao *headspace* (t_{ext}) e a força iônica da solução-amostra (FI) expressa pela concentração de NaCl no meio. Os valores iniciais para estas variáveis foram:

- T: 40°C e 60°C;
- t_{eq} : 30 min e 60 min;
- t_{ext} : 20 min e 40 min;
- FI: 0 % NaCl (água pura) e 36% m/v NaCl (solução saturada)

Para cada uma das extrações necessárias, 0,2 mL de um solução $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol e 14,0 mL de água pura (FI = 0%) ou solução saturada de NaCl (FI = 36%) foram adicionadas num frasco para amostras de 25 mL, que foi termostatizada na temperatura T por t_{eq} min, sob agitação magnética constante e suficiente para formação de um vórtex estável na interface amostra / *headspace*. A seguir, uma fibra CAR foi exposta por t_{ext} min ao *headspace* desta solução e imediatamente introduzida por 3 min no injetor do cromatógrafo, nas condições descritas em 4.4.A.. Os dados foram processados pelos programas FATORIAL, que acompanha a [56], e Statistica (Statsoft Inc., Tulsa – OK, EUA) v. 5.5. Um esquema simplificado do processo é apresentado abaixo.



- A) frasco lacrado (25 mL)
15 mL solução geraniol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
em água ou sol. saturada de NaCl
T(°C) – 40 ou 60
 t_{eq} (min) – 30 ou 60
- B) Introdução da fibra e exposição ao
headspace
 t_{ext} (min) – 20 ou 40
- C) Retirada da fibra e injeção no CG

Na primeira série de ensaios foram realizadas extrações com todas as combinações possíveis de FI, T, t_{eq} e t_{ext} arranjadas segundo um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . Neste ensaio foi avaliada a importância da força iônica do meio na quantidade de analito (geraniol) extraída pela fibra CAR. Já era esperada uma maior quantidade de analito extraída nos ensaios utilizando solução de NaCl [57, 58], pois os sais tendem a favorecer a liberação de compostos orgânicos voláteis presentes em solução. Os valores das variáveis estudadas, assim como a quantidade de analito extraída são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e massas recuperadas m de geraniol.

#	T / °C	t_{eq} / min	T_{ext} / min	FI / % NaCl	m / μg
1	40	30	20	0	0,34
2	60	60	20	0	0,44
3	60	30	40	0	0,39
4	40	60	40	0	0,33
5	60	30	20	36	1,71
6	40	60	20	36	1,09
7	40	30	40	36	1,55
8	60	60	40	36	2,04

Avaliando-se os dados da tabela 2 observa-se de maneira mais simplista para a variável FI, que nos ensaios utilizando solução 36% NaCl a extração do analito pela fibra é muito mais eficiente (média de 1,6 μg), do que nos ensaios onde fez-se uso apenas de água (média de 0,38 μg). Esta observação pode ser confirmada através do processamento dos dados pelo programa FATORIAL, onde foram obtidos os valores para os efeitos principais e suas interações.

Média	0,98
Efeitos principais	T = 0,32
	$t_{eq} = -0,02$
	$t_{ext} = 0,18$
	FI = 1,22
Interações	$(T \times t_{eq}) \approx (t_{ext} \times FI) = 0,21$
	$(T \times t_{ext}) \approx (t_{eq} \times FI) = -0,04$
	$(T \times FI) \approx (t_{ext} \times t_{eq}) = 0,23$

Com base nesses valores, observa-se que incrementos na FI, T e t_{ext} aumentam a massa de analito extraída. Com relação a variável t_{eq} , o valor obtido para a estimativa de seu efeito não afeta significativamente os resultados, assim como as estimativas de suas interações. Entretanto, como esta primeira série de ensaios foi feita através de planejamento fatorial fracionário, não é prudente descartar a variável t_{eq} , que será alvo de estudo nos ensaios que se seguem. Com relação a variável FI, a constatação inicial é confirmada, e como 36% NaCl corresponde a uma solução saturada, o valor deste parâmetro não pode ser aumentado, sendo adotado para os demais ensaios.

A maior quantidade de analito extraída com o aumento da FI do meio é concordante com a literatura [59, 60] que atribuem este fato a diminuição da solubilidade de compostos hidrofóbicos nestas soluções com consequente aumento de sua pressão de vapor, resultando num aumento de concentração no *headspace*.

Definido o valor da variável FI, foi realizada uma segunda série de ensaios através de um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central avaliando-se as variáveis T, t_{eq} e t_{ext} . Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial completo 2^3 e massas recuperadas m de geraniol.

#	T / °C	t_{eq} / min	t_{ext} / min	m / μg	#	T / °C	t_{eq} / min	t_{ext} / min	m / μg
1	40	30	20	0,98	10	66,8	45	30	2,03
2	60	30	20	1,96	11	50	19,8	30	2,58
3	40	60	20	1,17	12	50	70,2	30	1,56
4	60	60	20	1,38	13	50	45	13,2	0,88
5	40	30	40	1,93	14	50	45	46,8	2,43
6	60	30	40	2,04	15	50	45	30	1,77
7	40	60	40	1,96	16	50	45	30	1,18
8	60	60	40	1,76	17	50	45	30	1,80
9	33,2	45	30	0,91					

Novamente, processando os dados através do programa FATORIAL, temos os valores abaixo para os efeitos principais e as respectivas interações.

Média	2,30
Efeitos principais	$T = 0,49$
	$t_{eq} = -0,05$
	$t_{ext} = 1,31$
Interações	$(T \times t_{eq}) = -0,20$
	$(T \times t_{ext}) = -0,05$
	$(t_{ext} \times t_{eq}) = -0,15$
	$(T \times t_{ext} \times t_{eq}) = -0,16$

Verifica-se um aumento da média da massa de analito extraída, indicando um refinamento das variáveis estudadas. Os dados acima também confirmam a hipótese sugerida na primeira série de ensaios com relação a variável t_{eq} , mostrando que mudanças nos valores atribuídos a esta variável não influenciaram o rendimento da extração, já que o efeito calculado para a mesma é próximo de zero. Desse modo, adotou-se o menor valor inicialmente testado ($t_{eq} = 30$ min.) nos demais ensaios. Os valores positivos para os efeitos T e t_{ext} indicam que incrementos nos valores dessas variáveis provocariam aumento na eficiência de extração pela fibra CAR. Com relação as interações, todos os valores obtidos são próximos de zero, sugerindo que as variáveis estudadas afetam independentemente a massa extraída.

Finalmente, um último conjunto de ensaios foi realizado para refinar os valores das variáveis T e t_{ext} . Foi montado um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central conforme a tabela 4 e os valores ajustados a uma superfície de resposta quadrática (figura 9).

Tabela 4 – Condições para as extrações previstas no planejamento fatorial completo 2^2 e massas recuperadas m de geraniol.

#	$T / ^\circ\text{C}$	t_{ext} / min	$m / \mu\text{g}$	#	$T / ^\circ\text{C}$	t_{ext} / min	$m / \mu\text{g}$
1	45	40	2,11	7	55	35,9	1,79
2	65	40	2,54	8	55	64,1	4,04
3	45	60	4,19	9	55	50	3,63
4	65	60	4,11	10	55	50	4,05
5	40,9	50	3,61	11	55	50	3,14
6	69,1	50	2,62				

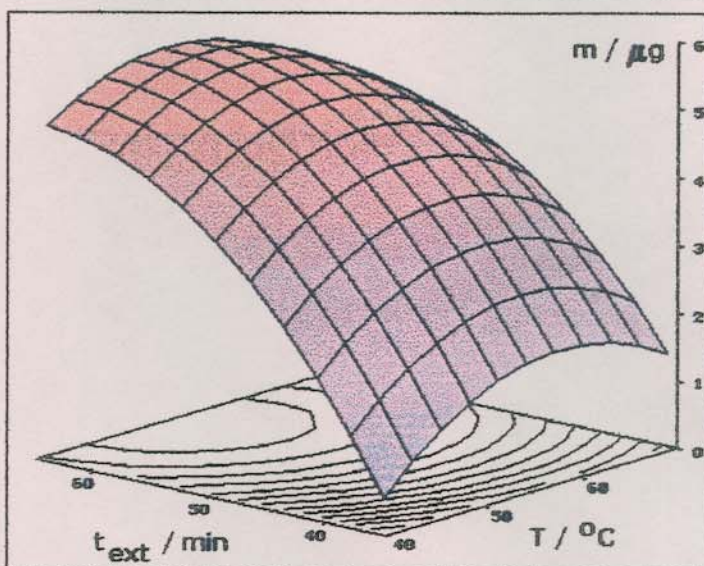


Figura 9 – Superfície de resposta $m \times T \times t_{\text{ext}}$ obtida no planejamento fatorial completo 2^2 .

A figura 9 mostra a superfície de resposta quadrática $m = I + (a_1.T^2) + (a_2.T) + (b_1.t_{\text{ext}}^2) + (b_2.t_{\text{ext}}) + (c_1.T.t_{\text{ext}})$ ajustada às massas extraídas nos ensaios. Os valores para os coeficientes dessa superfície foram:

$$I = (4,72 \pm 0,06)$$

$$a_1 = (-0,41 \pm 0,04)$$

$$a_2 = (0,05 \pm 0,03)$$

$$b_1 = (-0,47 \pm 0,04)$$

$$b_2 = (1,22 \pm 0,03)$$

$$c_1 = (-0,16 \pm 0,05)$$

O coeficiente de correlação obtido foi de $r^2 = 0,964$, valor adequado para este tipo de ensaio. Através da superfície de resposta acima obteve-se a maximização de massa extraída em $T = 52,6^\circ\text{C}$ e $t_{\text{ext}} = 65,6$ min. O intervalo com 95 % de confiabilidade para c_1 (que representa a interação entre T e t_{ext}) foi calculado, sendo de $-0,38$ a $+0,05$. Isto implica que o coeficiente é estatisticamente indistinguível de zero e que portanto, os efeitos conjuntos destas variáveis sobre a eficiência de extração não são interdependentes.

Assim, as condições operacionais que maximizam o rendimento de extração do analito-teste por SPME usando fibra CAR são:

- FI = 36% NaCl,
- $T = 52,6^\circ\text{C}$,
- $t_{\text{eq}} = 30$ min e
- $t_{\text{ext}} = 65,6$ min.

Por razões de ordem prática os ensaios realizados na continuidade do trabalho foram conduzidos com $T = 55^{\circ}\text{C}$ e $t_{\text{ext}} = 60$ min, já que a diminuição de rendimento em relação às condições ótimas é pequena.

Cabe aqui uma observação quanto ao tempo de exposição da fibra no injetor do cromatógrafo para dessorção dos analitos. Esta seria mais uma variável a ser estudada, entretanto, através de dados da literatura [17, 61] já era sabido que a dessorção ocorre em um intervalo de tempo muito pequeno (poucos segundos para os analitos estudados). O tempo de exposição da fibra no injetor para todos os experimentos foi de 3 minutos, portanto, muito superior ao necessário para dessorção. Além disso, intercalando-se entre as análises cromatográficas, foram realizadas inserções da fibra no injetor do CG para verificar o “efeito de memória” da fibra, isto é, se uma pequena quantidade de analito não havia sido dessorvida podendo interferir nas análises posteriores. Este fenômeno não foi observado em nenhum teste realizado, concluindo-se que o tempo de 3 minutos foi satisfatório.

5.2. Comparação entre as fibras P100 e CAR.

Todos os ensaios realizados para otimização das condições operacionais foram feitos utilizando-se uma fibra recoberta com $75\ \mu\text{m}$ de Carboxen/PDMS (CAR). Dados da literatura [9, 11, 12 e 13] reportam o uso desta fibra e também da fibra recoberta com $100\ \mu\text{m}$ de polidimetilsiloxano (P100) como as mais apropriadas para extrações de compostos orgânicos voláteis de plantas. Para elucidar esta divergência de informações, nesta fase do trabalho foi estudada a eficiência de extração das fibras CAR e P100 para compostos orgânicos voláteis típicos de plantas aromáticas.

Soluções contendo $1000\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos analitos α -pineno, β -pineno, limoneno, geraniol, acetato de geranila, *cis*-nerolidol e *trans*-nerolidol (comumente encontrados em óleos essenciais) foram analisadas conforme as condições otimizadas em 5.1. ($T = 55^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{eq}} = 30$ min e $\text{FI} = 36\%$ NaCl), com exceção da variável t_{ext} , que teve seu valor estudado num intervalo de 10 à 60 minutos para as fibras CAR e P100. As análises foram realizadas conforme 4.4.A. e as áreas de cada analito nos respectivos tempos de extração, foram normalizadas em relação à área obtida para o menor tempo de extração de acordo com a equação 11.

$$N = 100 \times \frac{A_x}{A_{ref}} \quad (\text{Equação 11})$$

onde N é a área normalizada, A_x a área obtida após X min de extração e A_{ref} a área obtida após 10 min de extração. As figuras a seguir mostram o comportamento de extração das 2 fibras em relação aos analitos estudados.

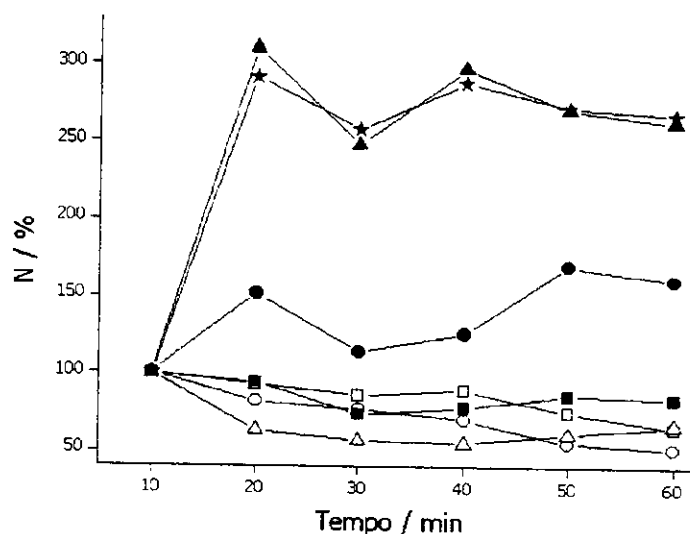


Figura 10 – Áreas normalizadas para os analitos em função do tempo de extração para a fibra CAR. Analitos: □ = α-pineno; ○ = β-pineno; △ = limoneno; ■ = geraniol; ● = acetato de geranila; ▲ = *cis*-nerolidol e ★ = *trans*-nerolidol.

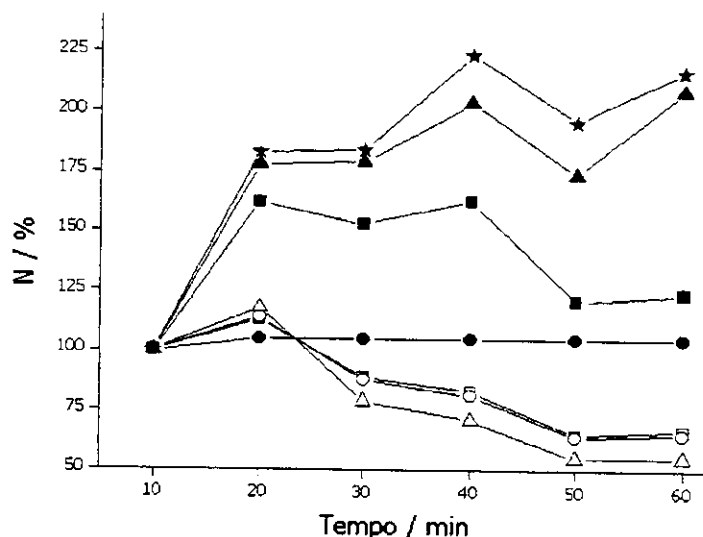


Figura 11 – Áreas normalizadas para os analitos em função do tempo de extração para a fibra P100. Analitos: □ = α-pineno; ○ = β-pineno; △ = limoneno; ■ = geraniol; ● = acetato de geranila; ▲ = *cis*-nerolidol e ★ = *trans*-nerolidol.

Para a fibra CAR (figura 10) não se observa um máximo claro para os analitos mais leves da série (α -pineno, β -pineno, limoneno e geraniol), enquanto para os demais após cerca de 20 min de extração, as massas extraídas tendem a flutuar em torno de um valor constante. Já para a fibra P100 (figura 11) observa-se um máximo de extração para os analitos mais leves com cerca de 20 minutos, sendo que a partir deste tempo, os valores tendem a diminuir. Para os demais analitos, o comportamento é semelhante ao da fibra CAR.

O cálculo das razões entre as áreas absolutas dos analitos para as fibras CAR e P100 a cada tempo de extração também foi avaliado. A figura 12 mostra os resultados obtidos.

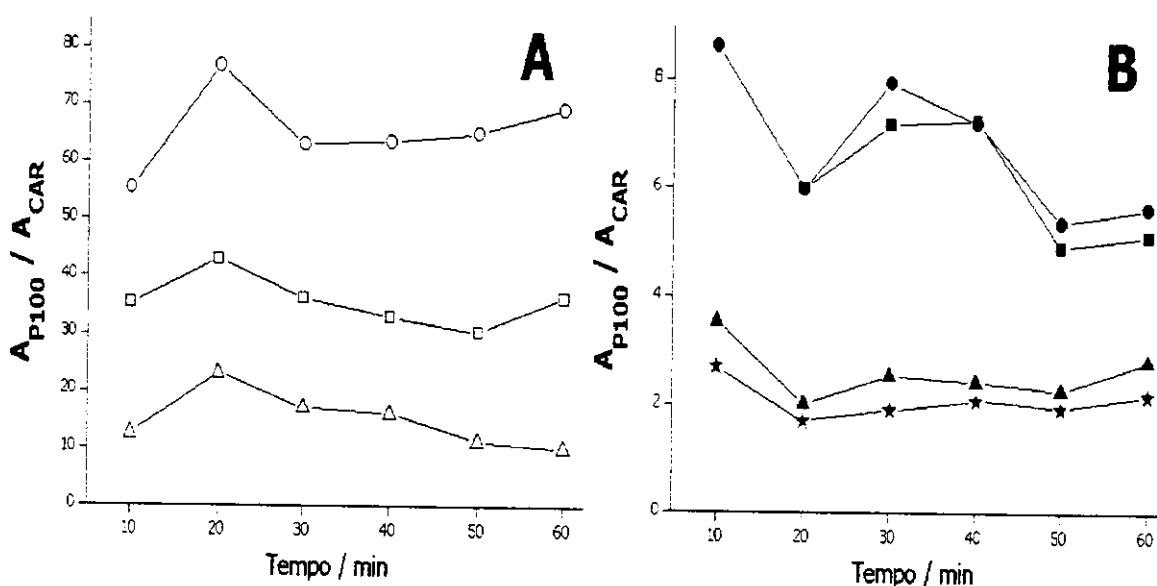


Figura 12 – Razões entre as áreas absolutas obtidas com as fibras P100 e CAR para α -pineno, β -pineno e limoneno (A) e para geraniol, acetato de geranila, *cis*-nerolidol e *trans*-nerolidol (B).

Analitos: $\square$ = α -pineno; $\circ$ = β -pineno; Δ = limoneno; $\blacksquare$ = geraniol; $\bullet$ = acetato de geranila; $\blacktriangle$ = *cis*-nerolidol e $\star$ = *trans*-nerolidol.

Observa-se que a fibra P100 proporciona maior eficiência na extração que a fibra CAR para os analitos testados, podendo ser distribuídos em dois grupos:

- Para α -pineno, β -pineno e limoneno, a diferença entre P100 e CAR é mais pronunciada. No intervalo de tempos de extração testado, os valores médios para A_{P100} / A_{CAR} são respectivamente (36 ± 4) , (65 ± 7) e (15 ± 4) . Os três analitos são monoterpenos saturados isômeros ($C_{10}H_{16}$) e relativamente apolares, portanto, com grande afinidade pelo recobrimento apolar da fibra P100.



Figura 14 – Cromatogramas obtidos para extrações da mistura de teste com a fibra P100 (A) e CAR (B) com $t_{\text{ext}} = 50$ min. Fundos de escala diferentes para cada cromatograma.

Também foram realizados ensaios com soluções de diferentes concentrações dos analitos como:

- 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de α - e β -pineno + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *cis*- e *trans*-nerolidol,
- 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de α - e β -pineno + 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol e acetato de geranila.

Para todos os ensaios o comportamento das fibras CAR e P100 foi semelhante ao já apresentado, sendo assim, avaliando-se todas as informações, decidiu-se adotar a fibra P100 para o restante dos trabalhos. O tempo de extração foi reduzido para 20 min. em função dos resultados obtidos com o processamento das soluções teste.

5.3. Avaliação dos parâmetros quantitativos

5.3.1. Reprodutibilidade e repetibilidade – a metodologia de extração foi testada quanto a sua reprodutibilidade utilizando-se uma fibra P100, e as variáveis $T = 55^\circ\text{C}$, $t_{\text{eq}} = 30$ min, $t_{\text{ext}} = 20$ min e $\text{FI} = 36\%$ NaCl. Para tanto, foram preparadas soluções contendo geraniol e acetato de geranila em dois níveis de concentração:

- Solução A – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acetato de geranila
- Solução B – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acetato de geranila

Para cada uma das soluções foram realizadas cinco extrações diárias, durante cinco dias consecutivos conforme metodologia descrita em 5.1. e 5.2.. Para cada série diária, a

reprodutibilidade foi estimada a partir do cálculo dos desvios-padrão relativos das áreas obtidas, valores apresentados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Estimativas de desvio-padrão relativo s_R em % para áreas de geraniol e acetato de geranila medidas (replicatas por dia = 5).

	Analito	s_R %				
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Solução A	Geraniol	8,3	8,6	9,5	8,4	7,4
	Acetato de geranila	9,2	4,5	9,8	7,0	8,6
Solução B	Geraniol	7,4	8,9	6,8	9,7	9,2
	Acetato de geranila	6,0	8,5	4,7	7,0	7,9

As estimativas de desvios-padrão relativo são de, no máximo, 9,8%, compatíveis com precisão necessária em trabalhos quantitativos. Para verificar possíveis variações da precisão com o analito, concentração ou dia de amostragem, os dados da tabela 5 foram submetidos a análise de variância (ANOVA) [62], com resultados mostrados na tabela 6.

Tabela 6 – Análise de variância dos dados de reprodutibilidade da tabela 5

Fonte de Variação	SQ	ν	MQ	F	F^{95}
Analito / Nível	8,82	3	2,94	1,04	3,49
Dia	1,14	4	0,286	0,101	3,26
Erro	34,0	12	2,83		
Total	43,9	19			

Nota: **SQ** = soma quadrática dos valores; ν = número de graus de liberdade; **MQ** = média quadrática dos valores; **F** = parâmetro do teste F calculado e F^{95} = valor crítico com 95% de confiança para o parâmetro F.

Os valores do parâmetro do teste **F** calculados após análise de variância dos dados são menores que os correspondentes valores críticos para 95% de confiabilidade. Isso implica que as estimativas de desvios-padrão listadas na Tabela 6 independem do analito e de sua concentração, ou seja, é razoável afirmar que a precisão obtida é representativa da técnica e não de um analito ou concentração em particular. Além disso, não houve variação detectável da reprodutibilidade durante a realização dos ensaios, que envolveram um número grande de extrações, isto é, os valores obtidos dos desvios-padrão não são estatisticamente diferentes entre si. A ausência de variação dia-a-dia na precisão das análises num estudo que envolveu mais de cinquenta extrações com a mesma fibra indica

que qualquer degradação do revestimento de PDMS que pudesse ter acontecido não interferiu na confiabilidade dos resultados obtidos.

5.3.2. Linearidade – para o ensaio de linearidade a metodologia usada foi a mesma do ensaio de reprodutibilidade (fibra P100, $T = 55^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{eq}} = 30 \text{ min}$, $t_{\text{ext}} = 20 \text{ min}$ e $\text{FI} = 36\% \text{ NaCl}$). Foi construída uma curva analítica (figura 15), utilizando-se uma solução de geraniol como analito teste, nas concentrações 21,4; 53,4; 106,8; 213,5; 320,5 e 427,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As extrações foram feitas em triplicata.

Com os dados das extrações foi obtida a equação da reta:

$$A = (895 \pm 44) C - (4634 \pm 10495)$$

onde: A = área do pico cromatográfico

C = concentração de geraniol em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

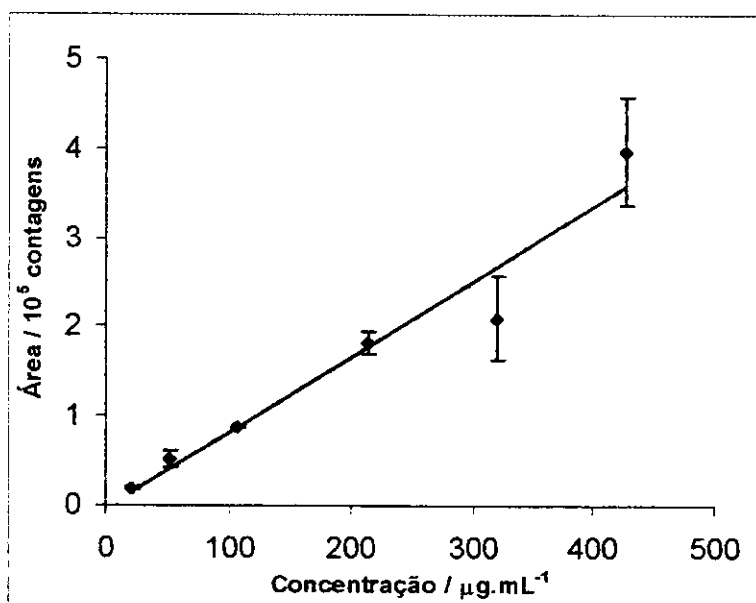


Figura 15 – Curva analítica para geraniol

A reta apresenta boa correlação ($r = 0,9953$), intercepto estatisticamente nulo e não existe tendência visível de afastamento da linearidade na faixa de massas estudada. Desta forma, e em vista das avaliações anteriores desta seção é razoável afirmar que a metodologia de extração até aqui estudada é potencialmente adequada aos estudos quantitativos deste tipo de analito em amostras vegetais.

5.4. Identificação dos constituintes voláteis

As amostras vegetais listadas em 4.2. foram finamente divididas e homogeneizadas e alíquotas de 0,2000 g dessas amostras foram pesadas diretamente nos frascos de amostra de 25 mL. Adicionaram-se 14,0 mL de solução saturada de NaCl e 1,0 mL de solução etanólica contendo $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de alcanos (de C-9 a C-25), para possibilitar o cálculo simultâneo dos índices de retenção dos analitos extraídos. O frasco foi lacrado e os constituintes voláteis extraídos segundo as condições otimizadas em 5.1. e 5.2. (fibra P100, $T = 55^\circ\text{C}$, $t_{\text{eq}} = 30 \text{ min}$, $t_{\text{ext}} = 20 \text{ min}$). Os materiais extraídos foram imediatamente dessorvidos e analisados por CG-EM, nas condições descritas em 4.4.B.. Os constituintes extraídos foram identificados por: comparação com as bibliotecas espectrais Wiley-138 e NIST-98; por comparação com dados de retenção e espectros de massa da literatura [63], coletados em condições cromatográficas similares. Quando disponíveis, padrões autênticos dos analitos foram cromatografados e os dados obtidos, comparados com os das análises das matrizes.

A seguir encontram-se as tabelas relacionando os constituintes voláteis identificados e também os cromatogramas representativos destas amostras.

Tabela 7 – Compostos voláteis identificados em *A. gratissima* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	7,08	α -pineno	934	0,18	1, 2, 3, 4
2	8,52	β -pineno	979	3,65	1, 2, 3, 4
3	8,90	β -mirceno	991	1,07	1, 2, 3, 4
4	10,41	Limoneno	1028	1,80	1, 2, 3, 4
5	11,12	β -ocimeno	1043	0,67	1, 2, 3
6	12,88	α -terpinoleno	1083	0,18	1, 2, 3
7	13,33	linalol	1093	2,15	1, 2, 3, 4
8	14,56	MM = 108	1120	0,32	----
9	15,27	<i>trans</i> -pinocarveol	1136	1,77	1, 2, 3
10	15,56	<i>Trans</i> -verbenol	1143	1,23	1, 2, 3
11	16,37	<i>trans</i> -pinocanfona	1161	10,86	1, 2, 3
12	16,92	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	4,02	1, 2, 3
13	17,30	Cimen-8-ol	1182	0,23	1, 2, 3
14	17,57	α -terpineol	1188	0,27	1, 2, 3
15	18,47	MM = 150	1208	0,13	----
16	18,82	<i>trans</i> -carveol	1216	0,22	1, 2, 3
17	19,93	carvona	1241	0,12	1, 2, 3
18	21,86	acetato de bornila	1285	0,51	1, 2, 3
19	21,99	MM = 166	1288	0,29	----
20	22,67	<i>trans</i> -acetato de pinocarveila	1303	9,27	1, 2, 3
21	25,98	α -copaeno	1378	0,15	1, 2, 3
22	26,41	β -bourboneno	1388	0,31	1, 2, 3
23	26,71	β -elemeno	1395	1,19	1, 2, 3
24	27,18	metil-eugenol	1405	0,19	1, 2, 3
25	28,11	<i>trans</i> -cariofileno	1427	5,95	1, 2, 3
26	28,56	γ -elemeno	1437	2,18	1, 2, 3
27	28,99	MM = 196	1448	0,20	----
28	29,52	α -humuleno	1460	2,65	1, 2, 3, 4
29	29,78	MM = 204	1466	0,26	----
30	30,75	germacreno D	1487	4,56	1, 2, 3
31	31,38	MM = 204	1503	2,37	----
32	32,08	MM = 222	1520	0,55	----
33	32,37	δ -cadineno	1527	0,40	1, 2, 3
34	32,78	MM = 220	1537	0,11	----
35	33,02	MM = 204	1542	0,36	----
36	33,57	elemol	1555	2,31	1, 2, 3
37	33,94	germacreno B	1564	2,95	1, 2, 3
38	34,82	espatulenol	1585	1,63	1, 2, 3
39	35,03	óxido de cariofileno	1590	2,49	1, 2, 3

40	35,74	MM = 222	1607	9,19	----
41	36,10	MM = 220	1617	1,82	----
42	37,24	MM = 254	1647	1,68	----
43	37,42	MM = 220	1652	0,63	----
44	37,81	MM = 236	1662	1,45	----
45	38,08	MM = 238	1669	0,26	----
46	38,40	MM = 222	1678	4,12	----
47	39,02	MM = 220	1694	0,34	----
48	41,66	MM = 220	1761	0,53	----
49	42,01	MM = 262	1770	0,49	----
Σ não-identificados ^c			----	9,73	

Notas: a) índice de retenção;

b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma;

c) fração em porcentagem da área total integrada do somatório das áreas dos picos não-identificados;

d) identificação dos analitos; 1) comparação com as bibliotecas espectrais Wiley-138 e NIST-98,

2) comparação com dados de retenção, 3) comparação com espectros de massa da literatura e 4) comparação com padrões autênticos

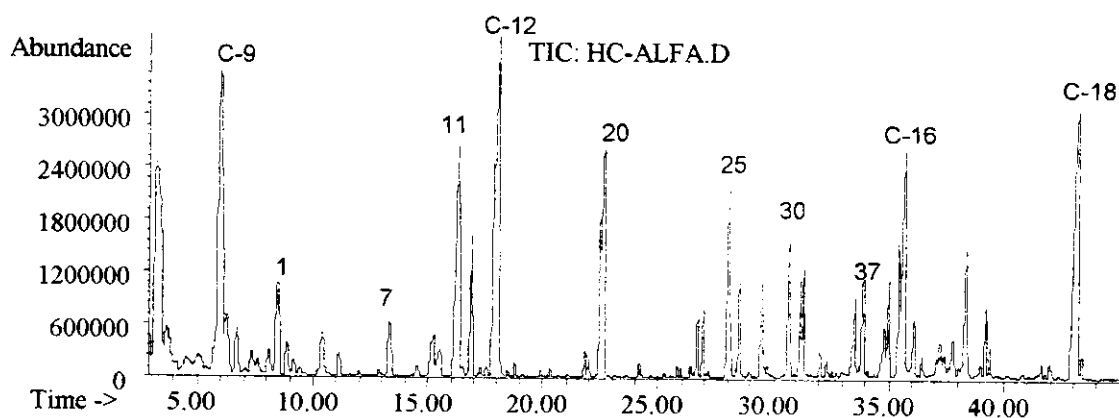


Figura 16 – Compostos voláteis de *A. gratissima* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 7.

Tabela 8 – Compostos voláteis identificados em *C. martinii* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	11,12	β-ocimeno	1043	0,73	1, 2, 3
2	13,42	Linalol	1095	4,10	1, 2, 3, 4
3	20,86	<i>trans</i> -geraniol	1262	68,18	1, 2, 3, 4
4	21,53	MM = 152	1278	0,73	-----
5	25,83	MM = 212	1375	0,24	-----
6	26,36	acetato de geranila	1386	10,29	1, 2, 3, 4
7	28,08	<i>trans</i> -cariofileno	1426	2,31	1, 2, 3
8	40,17	<i>cis</i> -farnesol	1724	1,10	1, 2, 3
		Σ não-identificados ^c	-----	12,32	

Notas: a), b) e c): q.v. Tabela 7.

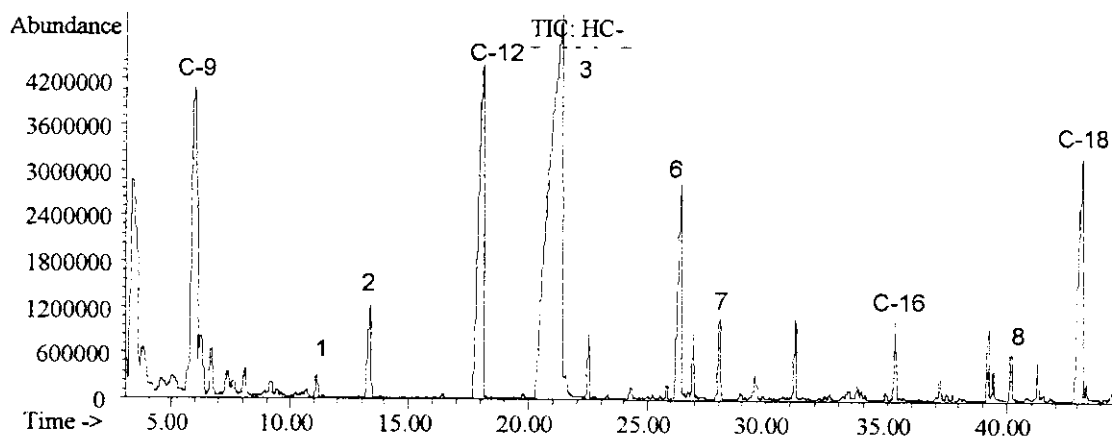


Figura 17 – Compostos voláteis de *C. martinii* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 8.

Tabela 9 – Compostos voláteis identificados em *M. X Piperita var. citrata* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	9,09	3-octanol	998	10,09	1, 2, 3
2	11,96	n-butirato de isopentila	1068	0,67	1, 2, 3
3	13,41	Linalol	1108	51,03	1, 2, 3, 4
4	14,37	cis-para-menth-2-em-1-ol	1123	0,52	1, 2, 3
5	16,97	Terpin-4-ol	1180	8,00	1, 2, 3
6	17,52	α -terpineol	1192	1,31	1, 2, 3
7	20,16	Carvona	1249	23,42	1, 2, 3
8	26,33	β -bourboneno	1385	0,18	1, 2, 3
9	27,95	trans-cariofileno	1422	2,31	1, 2, 3
10	30,54	Germacreno D	1482	0,44	1, 2, 3
Σ não-identificados ^c			----	2,04	

Notas: a) , b) e c): q.v. Tabela 7.

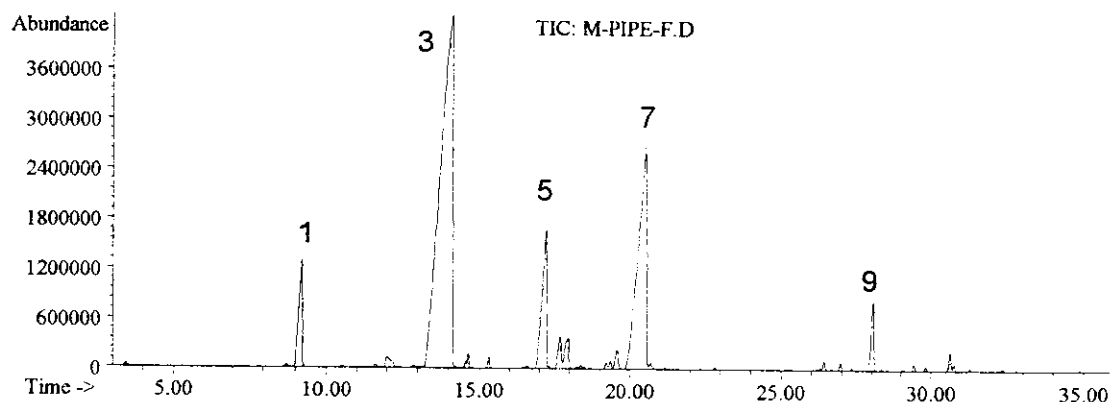


Figura 18 – Compostos voláteis de *M. X Piperita var. citrata* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 9.

Tabela 10 – Compostos voláteis identificados em *M. spicata* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	20,85	MM = 148	1265	1,10	----
2	21,20	MM = 150	1272	0,44	----
3	25,84	óxido de piperitenona	1373	94,79	1, 2, 3
4	27,25	jasmona	1404	0,57	1, 2, 3
5	27,42	MM = 166	1408	1,09	----
6	29,39	β-fameseno	1454	0,76	1, 2, 3
7	30,63	γ-muuroleno	1484	1,06	1, 2, 3
Σ não-identificados ^c			----	0,00	

Notas: a) , b) e c): q.v. Tabela 7.

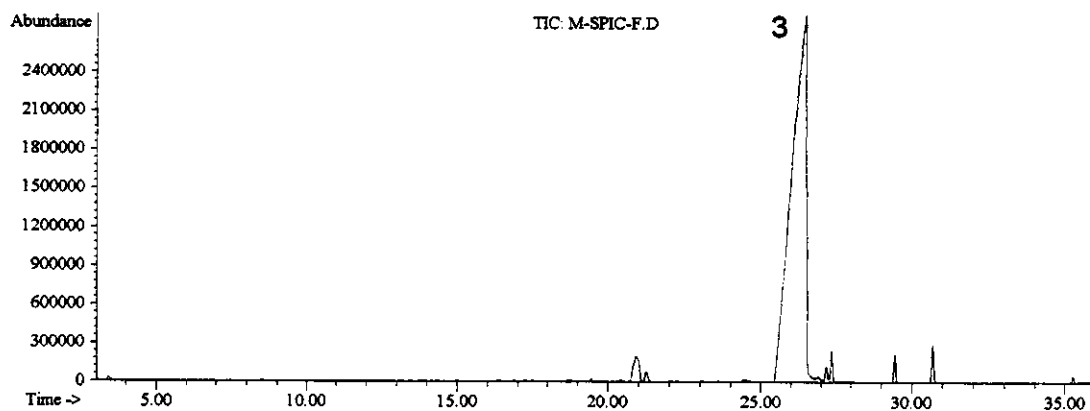


Figura 19 – Compostos voláteis de *M. spicata* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 10.

Tabela 11 – Compostos voláteis identificados em *O. vulgare* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	8,45	1-octen-3-ol	978	0,68	1, 2, 3
2	10,19	p-cimeno	1024	1,50	1, 2, 3
3	10,63	trans- β -ocimeno	1035	0,39	1, 2, 3
4	11,57	γ -terpineno	1057	1,99	1, 2, 3
5	11,96	MM = 154	1067	0,46	-----
6	12,82	Terpinoleno	1087	0,31	1, 2, 3
7	14,36	menth-2-en-1-ol <cis, para>	1122	1,47	1, 2, 3
8	15,18	menth-2-en-1-ol <trans, para>	1140	0,86	1, 2, 3
9	16,55	Borneol	1169	2,52	1, 2, 3
10	16,87	terpin-4-ol	1176	33,33	1, 2, 3
11	17,69	α -terpineol	1191	4,25	1, 2, 3
12	18,31	trans-piperitol	1208	0,16	1, 2, 3
13	19,42	timol, metil éter	1231	0,24	1, 2, 3
14	19,87	carvacrol, metil éter	1241	1,33	1, 2, 3
15	21,80	acetato de bomila	1283	0,20	1, 2, 3
16	22,31	Timol	1294	37,99	1, 2, 3
17	26,14	acetato de geranila	1379	0,33	1, 2, 3, 4
18	28,01	trans-cariofileno	1422	2,66	1, 2, 3
19	30,60	Germacreno D	1484	1,47	1, 2, 3
20	31,72	β -bisaboleno	1510	1,05	1, 2, 3
21	34,68	Espatuleno	1580	1,44	1, 2, 3
22	34,91	Óxido de cariofileno	1586	1,07	1, 2, 3
23	37,69	α -cadinol	1656	0,29	1, 2, 3
Σ não-identificados ^c			-----	4,03	

Notas: a), b) e c): q.v. Tabela 7.

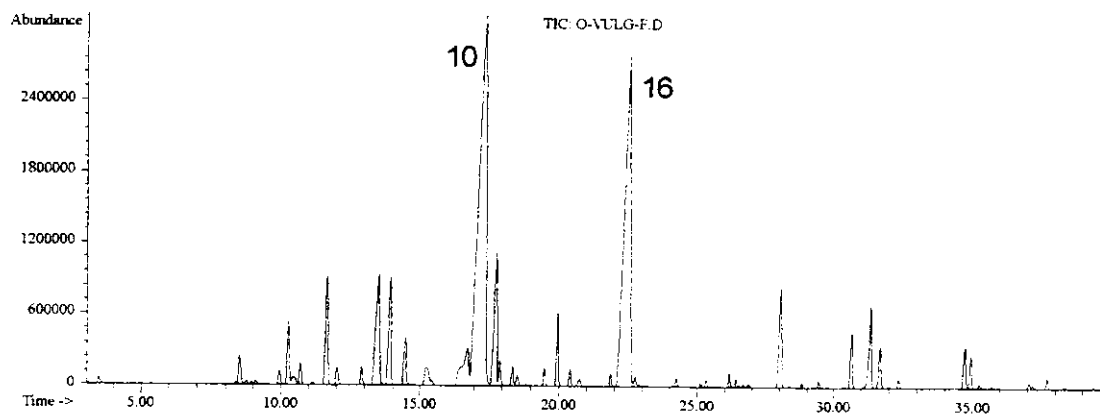


Figura 20 – Compostos voláteis de *O. vulgare* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 11.

Tabela 12 – Compostos voláteis identificados em *O. applii* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	13,44	Linalol	1102	4,92	1, 2, 3, 4
2	16,91	terpin-4-ol	1178	3,08	1, 2, 3
3	17,22	p-cimen-8-ol	1185	0,64	1, 2, 3
4	19,42	timol, metil éter	1233	1,47	1, 2, 3
5	19,92	carvacrol, metil éter	1244	5,91	1, 2, 3
6	20,77	MM = 154	1262	0,90	----
7	22,23	Timol	1294	64,52	1, 2, 3
8	22,76	MM = 150	1306	0,94	----
9	26,39	β-bourboneno	1386	1,35	1, 2, 3
10	27,94	MM = 204	1421	0,60	----
11	28,35	β-gurjuneno	1430	0,36	1, 2, 3
12	29,70	<allo> aromadendreno	1461	0,28	1, 2, 3
13	30,66	germacreno D	1483	4,79	1, 2, 3
14	31,73	β-bisaboleno	1508	1,98	1, 2, 3
15	32,37	γ-cadineno	1524	0,89	1, 2, 3
16	34,66	Espatulenol	1580	1,62	1, 2, 3
17	36,01	MM = 220	1613	0,44	----
18	37,20	epi-α-muurolol	1643	0,72	1, 2, 3
19	37,36	MM = 220	1647	0,51	----
20	37,73	α-cadinol	1657	1,53	1, 2, 3
21	38,96	MM = 220	1688	1,19	----
Σ não-identificados ^c			----	1,35	

Notas: a) , b) e c): q.v. Tabela 7.

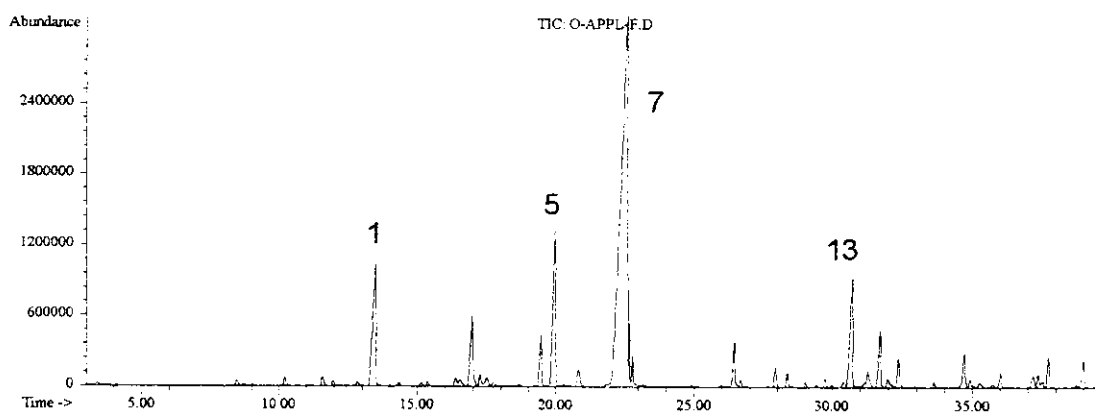


Figura 21 – Compostos voláteis de *O. applii* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 12.

Tabela 13 – Compostos voláteis identificados em *O. basilicum* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	10,47	1,8-cineol	1031	1,05	1, 2, 3, 4
2	12,85	fenchona	1088	0,53	1, 2, 3
3	13,80	linalol	1106	32,58	1, 2, 3, 4
4	15,63	cânfora	1150	10,08	1, 2, 3
5	16,44	MM = 136	1167	0,63	-----
6	16,94	terpin-4-ol	1178	0,99	1, 2, 3
7	17,67	α -terpineol	1194	3,90	1, 2, 3
8	25,63	eugenol	1362	28,09	1, 2, 3
9	26,03	MM = 204	1377	0,16	-----
10	26,43	β -bourboneno	1386	0,23	1, 2, 3
11	26,76	β -elemeno	1393	1,92	1, 2, 3
12	28,06	trans-cariofileno	1423	2,00	1, 2, 3
13	28,61	β -bergamoteno	1435	1,66	1, 2, 3
14	28,75	α -guaieno	1438	0,29	1, 2, 3
15	29,46	α -humuleno	1455	0,77	1, 2, 3
16	30,74	germacreno D	1485	5,49	1, 2, 3
17	31,66	δ -guaieno	1506	0,68	1, 2, 3
18	32,06	γ -cadineno	1516	1,27	1, 2, 3
19	32,37	δ -cadineno	1524	0,29	1, 2, 3
20	36,16	MM = 204	1617	0,70	-----
21	37,34	α -muurolol	1647	5,81	1, 2, 3
22	37,66	α -eudesmol	1655	0,24	1, 2, 3
23	37,74	α -cadinol	1657	0,38	1, 2, 3
Σ não-identificados ^c			-----	0,25	

Notas: a) , b) e c): q.v. Tabela 7.

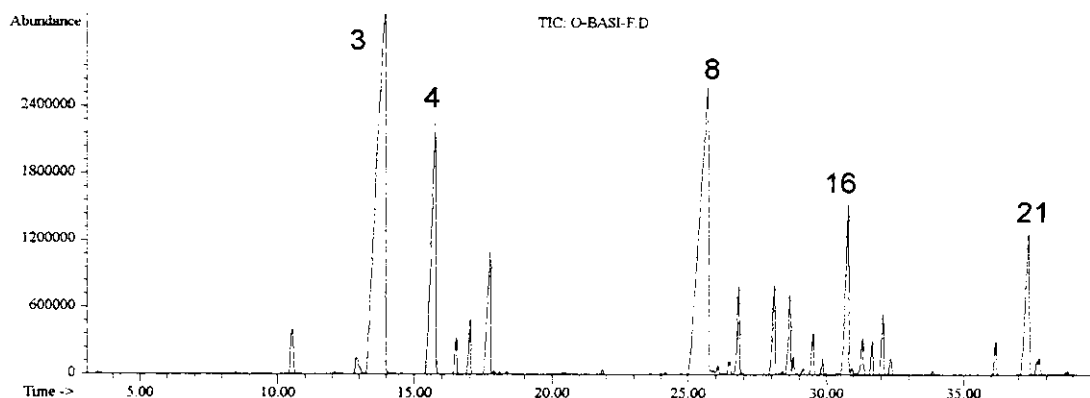


Figura 22 – Compostos voláteis de *O. basilicum* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 13.

Tabela 14 – Compostos voláteis identificados *O. gratissimum* após extração com SPME.

#	t _R / min	Composto	IR ^a	% ^b	Identificação ^d
1	16,84	terpin-4-ol	1177	0,26	1, 2, 3
2	25,18	eugenol	1358	93,94	1, 2, 3
3	28,11	trans-cariofileno	1423	1,08	1, 2, 3
4	30,75	germacreno D	1485	4,23	1, 2, 3
5	32,38	δ-cadineno	1524	0,19	1, 2, 3
6	37,69	α-cadinol	1656	0,16	1, 2, 3
Σ não-identificados ^c			----	0,15	

Notas: a) , b) e c): q.v. Tabela 7.

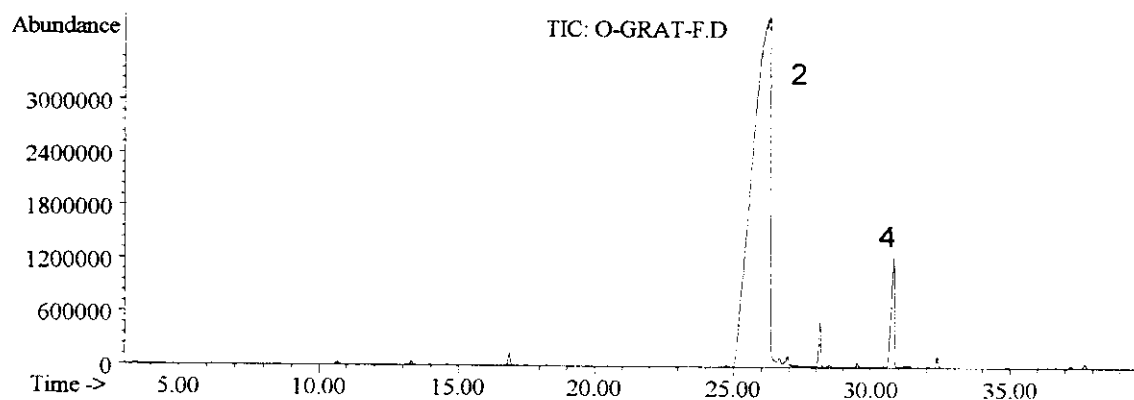


Figura 23 – Compostos voláteis de *O. gratissimum* (seção do cromatograma).
Identificação dos picos: q.v. Tabela 14.

5.5. Quantificação de constituintes voláteis selecionados

Os analitos mais importantes de *C. martinii* – geraniol e acetato de geranila – foram quantificados por SPME e os resultados foram comparados com os obtidos por uma metodologia convencional (separação do óleo essencial por destilação em Clevenger e injeção convencional do óleo).

5.5.1. Quantificação convencional – 40,0 gramas de *C. martinii* foram pesadas em balão de 1000 mL, adicionados 700 mL de água destilada e submetida a extração por Clevenger por um período de 3 horas. Para quantificação dos analitos, foram construídas curvas de calibração para geraniol (1,92 a 15,38 mg.mL⁻¹ em acetato de etila) e acetato de geranila (0,53 a 4,27 mg.mL⁻¹ em acetato de etila). O óleo obtido foi solubilizado em solvente orgânico e a análise feita em duplicata. Foi utilizado o hidrocarboneto C-9 (n-nonano) como padrão interno para padrões e amostra. Os resultados são apresentados na tabela 15.

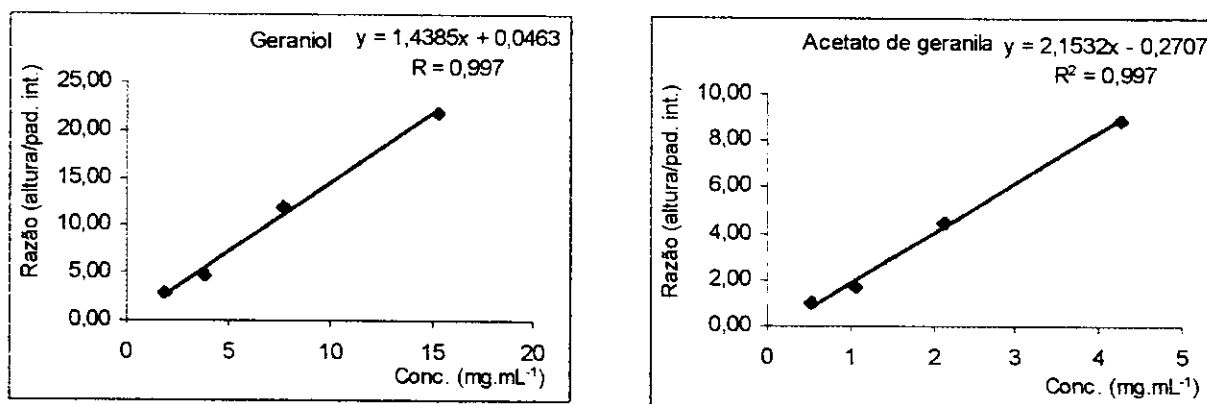


Figura 24 – Curvas de calibração para geraniol e acetato de geranila – quantificação convencional

5.5.2. Quantificação por SPME - Misturas de padrões de geraniol/acetato de geranila de diferentes concentrações (20,2 a 201,9 µg.mL⁻¹ para geraniol – 4,8 a 48,3 µg.mL⁻¹ para acetato de geranila), foram preparadas e analisadas como descrito: em um frasco de 25 mL foram adicionados 14,0 mL de solução saturada de NaCl e 1,0 mL de solução padrão. Em seguida o frasco foi lacrado e realizado o procedimento de extração com as variáveis otimizadas em 5.1. e 5.2. (fibra P100, T = 55°C, t_{eq} = 30 min, t_{ext} = 20 min). Repetiu-se o procedimento para as demais concentrações de soluções padrão, e com os dados obtidos foram construídas curvas de calibração para os analitos citados.

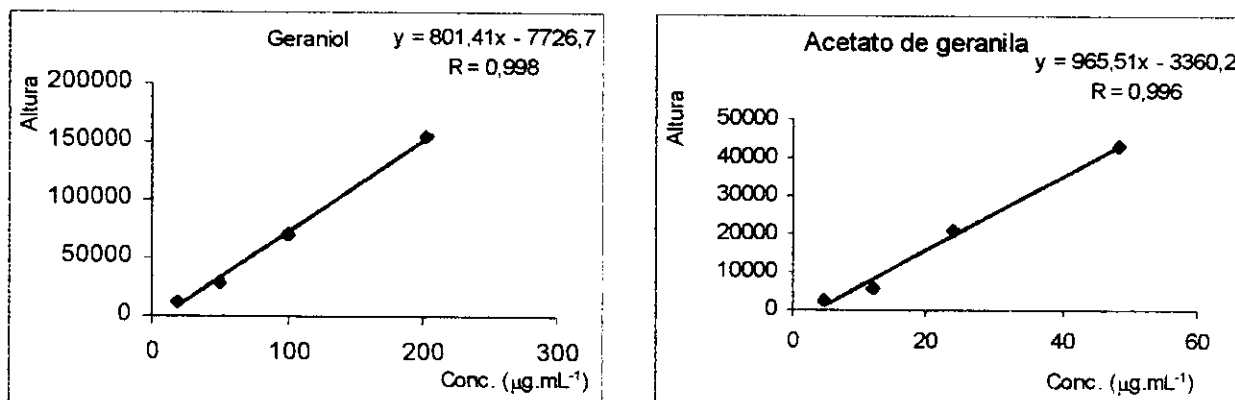


Figura 25 – Curvas de calibração para geraniol e acetato de geranila – quantificação por SPME

Em seguida, uma alíquota de 200,0 mg de *C. martinii* foi pesada em frasco de 25 mL, adicionados 15,0 mL de solução saturada de NaCl, lacrado com septo de silicone e desenvolvido o procedimento para SPME. A análise foi feita em triplicata e com os dados obtidos calculou-se o teor dos analitos através das curvas de calibração (tabela 15).

Tabela 15 – Teor de geraniol e acetato de geranila em *C. martinii*

Composto	Teor (%)* – Convencional	Teor (%)* – SPME
Geraniol	0,65	0,75
Acetato de geranila	0,06	0,05

Nota: * teor na planta fresca

Os resultados obtidos apresentam uma variação de 15% para maior no teor de geraniol, quando da quantificação por SPME. Esta diferença pode ser atribuída a pequena quantidade de amostra vegetal que pode ser amostrada para a análise por SPME (200 vezes menor que a utilizada na extração por Clevenger), devido a limitações do sistema, o que em se tratando de amostras vegetais, pode ocasionar desvios dessa magnitude.

6. CONCLUSÕES

- Não há interdependência entre as variáveis operacionais estudadas para operação de SPME. Elas podem ser otimizadas independentemente.
- A fibra de polidimetilsiloxano (P-100) mostrou-se mais eficiente na extração dos analitos que a fibra Carboxen (CAR), apresentando recuperação até 65 vezes maior para moléculas de baixa massa molar.
- A durabilidade da fibra P-100 pode ser observada, não diminuindo sua eficiência de extração, apesar do grande número de ensaios realizados (>150).
- A técnica SPME mostrou-se adequada a caracterização de constituintes voláteis das plantas aromáticas estudadas.
- A metodologia mostrou-se viável para uso rotineiro nas pesquisas desenvolvidas no CPQBA/UNICAMP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. C. L. Arthur, D. W. Potter, K. D. Buchholz, S. Motlagh e J. Pawliszyn: *LC-GC*, 10, 656 (1992).
2. C. L. Arthur, L. M. Killam, K. D. Buchholz e J. Pawliszyn, , "Automation and Optimization of Solid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 64, 1960 (1992).
3. J. Pawliszyn: "Solid Phase Micro-Extraction (SPME)". Hipertexto (sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme.html), 1998.
4. J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction - Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, 1997.
5. J. Pawliszyn (editor), Applications of Solid Phase Microextraction, RSC, Cambridge, 1999.
6. B. Schaffer, P. Hennig, W. Engewald, , "Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid-phase microextraction", *J. High. Resolut. Chromatogr.*, 18, 587 (1995).
7. W. M. Coleman III, B. M. Lawrence, "A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil", *Flavour Fragrance J.*, 12, 1, 1997.
8. J. Rohloff, "Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha X piperita* L.) with regard of leaf position using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3782 (1999).
9. D.A. Vereen, J.P. McCall, D.J. Butcher, "Solid phase microextraction for the determination of volatile organics in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*)", *Microchem. J.*, 65, 269 (2000).
10. M. An, T. Haig, P. Hatfield, "On-site sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 917, 245, (2001).

11. C. Bicchi, S. Drigo, P. Rubiolo, "Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants", *J. Chromatogr. A*, 892, 469 (2000).
12. C. Bicchi, C. Cordero, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, "Headspace sorptive extraction (HSSE) in the headspace analysis of aromatic and medicinal plants", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 23, 539 (2000).
13. J. Vercammen, P. Sandra, T. Sandra, F. David, "Considerations on static and dynamic sorptive and adsorptive sampling to monitor volatiles emitted by living plants", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 23, 547 (2000).
14. C. L. Arthur e J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.*, 62, 2145 (1990).
15. D. Louch, S. Motlagh e J. Pawliszyn, "Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers", *Anal. Chem.*, 64, 1187 (1992).
16. K. D. Buchholz e J. Pawliszyn, "Determination of phenols by solid phase microextraction and gas chromatographic analysis", *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2844 (1993).
17. Z. Zhang, M. Yang e J. Pawliszyn, "Solid-Phase Microextraction", *Anal. Chem.*, 66, 844A (1994).
18. S. Motlagh e J. Pawliszyn, "On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography", *Anal. Chim. Acta*, 284, 265 (1993).
19. Z. Zhang e J. Pawliszyn, "Headspace Solid-phase Microextraction", *Anal. Chem.*, 65, 1843 (1993).
20. Z. Zhang e J. Pawliszyn, "Studying activity coefficients of probe solutes in selected liquid polymer coatings using solid phase microextraction", *J. Phys. Chem.*, 100, 17648 (1996).

21. P. Martos, A. Saraullo e J. Pawliszyn, "Estimation of air/coating distribution coefficients for solid phase microextraction using retention indexes from linear temperature-programmed capillary gas chromatography. Application to the sampling and analysis to total petroleum hydrocarbons in air", *Anal. Chem.*, 69, 402 (1997).
22. P. Martos e J. Pawliszyn, "Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating", *Anal. Chem.*, 69, 206 (1997).
23. J. Pawliszyn, "Chemical sensing using concentration gradient transients produced during diffusive transport of analytes", *Anal. Chem.*, 64, 1552 (1992).
24. G. W. Castellan, *Physical Chemistry*, 2ª ed., Addison-Wesley, Reading, MA, p.689 (1972).
25. J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction - Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, pag. 66, (1997).
26. J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction - Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, pag. 82, (1997).
27. J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction - Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, pag. 80, (1997).
28. J. A. Field, G. Nickerson, D. D. James e C. Heider, "Determination of essential oils in hops by headspace solid phase microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1768, (1996).
29. R. E. Shirey, V. Mani. Pittcon Conference, Atlanta, GA, (1997).
30. J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction - Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, pag. 109, (1997).
31. T. Gorecki, J. Pawliszyn, "Determination of tetraethyllead and inorganic lead in water by solid phase microextraction/gas chromatography", *Anal. Chem.*, 68, 3008, (1996).

32. Y. Wang, M. Bonilla, H. M. McNair, "Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of food products", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 20, 213 (1997).
33. C. Grote e J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction for the analysis of human breath", *Anal. Chem.*, 69, 587 (1997).
34. Z. Zhang e J. Pawliszyn, "Sampling volatile organic compounds using a modified solid phase microextraction device", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19, 155 (1996).
35. M. F. Alpendurada, "Solid-phase microextraction: a promissing technique for sample preparation in environmental analysis", *J. Chromatogr. A*, 889, 3, (2000).
36. C. H. Xiao, Z. L. Liu, Z. Y. Wang, C. Y. Wu, H. M. Han, "Use of polymeric fullerene as a new coating for solid-phase microextraction", *Chromatographia*, 52, 803, (2000).
37. A. Penalver, E. Pocurull, P. Borrull, R. M. Marce, "Evaluation of parameters in solid-phase microextraction process", *Chromatographia*, 50, 685, (1999).
38. M. Ábalos, J. M. Bayona, J. Pawliszyn, "Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters", *J. Chromatogr. A*, 873, 107, (2000).
39. Z. Takáts, K. Torkos, "Determination of chlorobenzenes in environmental samples using solid-phase microextraction, thermal desorption and analysis by gas chromatography coupled to FID, ECD, MSD, IRD detectors", *Chromatographia*, 48, 74, (1998).
40. D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, "Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters", *J. Chromatogr. A*, 922, 243, (2001).
41. J. A. Field, G. Nickerson, D. D. James, C. Heider, "Determination of essential oils in hops by headspace Solid-phase microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1768, (1996).

-
42. R. Doong, P. Liao, "Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction", *J. Chromatogr. A*, 918, 177, (2001).
 43. J. L. Vilchez, A. Prieto, L. Araujo, A. Navalón, "Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 919, 215, (2001).
 44. A. L. P. Valente, F. Augusto, L. Montero, E. C. Rocha, "Aplicação de SPME (Solid-Phase Microextraction) na análise de águas potáveis de três localidades do estado de São Paulo", *Quím. Nova*, 21, 804, (1998).
 45. M. Kovacevic, M. Kac, "Solid-phase microextraction of hop volatiles potential use for determination and verification of hop varieties", *J. Chromatogr. A*, 918, 159, (2001).
 46. M. A. Pozo-Bayón, E. Pueyo, P. J. Marín-Álvarez, M. C. Polo, "Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines – Its application to the characterization of varietal wines", *J. Chromatogr. A*, 922, 267, (2001).
 47. J. S. Elmore, D. S. Mottram, E. Hierro, "Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork", *J. Chromatogr. A*, 905, 223, (2000).
 48. G. Fitzgerald, K. J. James, K. MacNamara, M. A. Stack, "Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 896, 351, (2000).
 49. A. Keszler, K. Héberger, M. Gude, "Identification of volatile compounds in sunflower oil by Headspace SPME and Ion-trap GC/MS", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21, 368, (1998).
 50. X. M. Wan, R. J. Stevenson, X. D. Chen, L. D. Melton, "Application of headspace solid-phase microextraction to volatile flavour profile development during storage and ripening of kiwifruit", *Food Res. Int.*, 32, 175, (1999).

51. F. Augusto, A. L. P. Valente, E. S. Tada, S. R. Rivellino, "Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 873, 117, (2000).
52. E. H. M. Koster, N. S. K. Hofman, G. J. Jong, "Direct solid-phase microextraction combined with gas and liquid chromatography for the determination of lidocaine in human urine", *Chromatographia*, 47, 678, (1998).
53. N. H. Snow, "Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices" *J. Chromatogr. A*, 885, 445, (2000).
54. S. C. N. Queiroz, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, "Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica", *Quím. Nova*, 24, 68, (2001).
55. S. A. Coran, V. Giannellini, S. Fumaletto, M. Bambagiotti-Alberti, S. Pinzauti, "Improving gas chromatographic determination of residual solvents in pharmaceutical by the combined use of headspace solid-phase microextraction and isotopic dilution", *J. Chromatogr. A*, 915, 209, (2001).
56. B. B. Neto, I. S. Scarminio e R. E. Bruns, "Planejamento e otimização de experimentos", UNICAMP, Campinas - SP, pp. 61 a 132, (1995).
57. W. M. Coleman III, "A study of the behavior of polar and nonpolar Solid-Phase Microextraction fibers for the extraction of Maillard reaction products", *J. Chromatogr. Sci.*, 35, 245, (1997).
58. W. M. Coleman III, "A study of the behavior of Maillard reaction products analyzed by Solid-Phase Microextraction-Gas chromatography-Mass selective detection", *J. Chromatogr. Sci.*, 34, 213, (1996).
59. X. Yang, T. Peppard, "Solid-phase microextraction for flavor analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1925, (1994).
60. K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, "Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols", *Anal. Chem.*, 66, 160, (1994).

61. S. B. Hawthorne, D. J. Miller, J. Pawliszyn, C. L. Arthur, "Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers", *J. Chromatogr. A*, 603, 185, (1992).
62. J. C. Miller e J. N. Miller, "Estadística para Química Analítica", Addison-Wesley Iberoamericana, 2ª ed., Washington – DE, pp. 148 a 162, (1993).
63. R. P. Adams, "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", Allured Publishing, 469 pag., (1995).

ANEXOS

ASSESSMENT OF VOLATILE CONSTITUENTS OF SOME BRAZILIAN AROMATIC PLANTS BY HEADSPACE SPME-GC

Adilson Sartoratto ¹ and Fabio Augusto ²

(1) CPQBA and (2) Institute of Chemistry

State University of Campinas (Unicamp); CP 6154 - 13083-970 Campinas – São Paulo, BRAZIL. ✉ augusto@iqm.unicamp.br

1. Introduction.

Solid Phase Micro-extraction (SPME) has been applied in several analytical procedures involving biological samples ¹. Among them, SPME has been described by several researchers as a convenient and reliable tool in the characterization of plant volatiles and related materials; applications already reported include classification of cinnamon ²⁻⁴. In this work, the application of headspace SPME for identification of volatile organic compounds found in several aromatic plants of medicinal or commercial importance (either native or acclimatized in Brazil.) will be addressed.

2. Experimental.

Materials. Leaves from *Aloysia gratissima* (whitebrush), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Menta spicata* (spearmint), *Menta piperita* var. *citrata* (peppermint), *Ocimum basilicum* (basil), *Ocimum gratissimum* (clove basil), *Origanum vulgare* (wild marjoran) and *Origanum applii* were collected at CPQBA Agricultural Field and kept in proper conditions until use. In preparatory experiments, aqueous solutions with up to 1000 µg mL⁻¹ of α-pinene, β-pinene, limonene, *trans*-geraniol, geranyl acetate, *cis*- and *trans*-nerolidol were used. Ethanol solutions with 50 µg mL⁻¹ of n-alkanes (C₉ to C₂₅) were also employed. Fibers covered with 100 µm PDMS (P100) and 75 µm Carboxen / PDMS (CAR) fitted in appropriate holders (Supelco Inc., Bellefont – PA) were used throughout this work. Samples were contained in sellable 25 mL glass vials capped with Teflon / silicone septa (Pierce, Rockford – IL) for the extractions. For the preliminary and quantitative experiments a HP-5890 GC-FID (Hewlett-Packard, Palo Alto – CA) fitted with a HP-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was used, and qualitative analysis was performed in a HP-5890 Series II GC with HP-5971 Mass Selective Detector and fitted with a HP-5 column (25 m x 0.20 mm x 0.33 µm).

a) *Preliminary Experiments.* The main operational conditions for the extractions (sample / headspace and headspace / fiber equilibrium times t_{eq} and t_{ext} , temperature T and NaCl concentration added to the solution, IS, to assess salting-out effect) were preliminarily outlined after headspace extractions of 15 mL of 40 µg mL⁻¹ aqueous *trans*-geraniol (expected to be the main constituent of most of the above-mentioned specimens) using CAR fibers. The essays were planned according to a factorial design strategy, to minimize the number of experiments needed to find out the optimum operational conditions. For the experiments here described, GC-FID was used for the separation and detection.

b) *Refining of Operational Conditions and Fiber Selection.* Series of headspace extractions under the preliminary conditions above determined and using P100 and CAR fibers were used to choose the fiber for the subsequent work and to fine tune the operational parameters. Solutions with 1000 µg mL⁻¹ of α-pinene, β-pinene, limonene, *trans*-geraniol, geranyl acetate, *cis*- and *trans*-nerolidol were used (expected to be important components of the real samples), and extraction time were ranged from 10 min to 60 min. Again, separation and detection of extracts was carried out using GC-FID.

c) *Screening of the Volatiles from Aromatic Vegetables.* For each sample, 0.2000 g of finely granddad leaves were mixed to 14.0 mL of satd. NaCl solution and 1.0 mL of the ethanolic n-alkane solution (markers for determination of retention indexes of extracted analytes). The suspension was stirred for 30 min at 55°C and then extracted with P100 fiber for 20 min, and the extracts separated and detected using GC-MSD. Identification of the chromatographic peaks was performed matching their mass spectra with the available libraries (Wiley and NIST98) and confirmed by co-injection of known pure standards (when available) or comparison of retention indexes.

3. Results and Discussion.

a) *Optimization of Operational Conditions.* After the preliminary experiments (2.a above), the conditions for maximum analyte recovering were defined as $t_{eq} = 30$ min, $t_{ext} = 60$ min, $T = 55^{\circ}\text{C}$ and $IS = 36\%$ m/v NaCl (= satd. aqueous solution). In addition, statistical analysis of the data revealed that the effects of these variables on the extraction efficiency are not interdependent, resulting that for the following fine-tuning studies they could be independently adjusted. The extraction time profiles for P100 and CAR (2.b) were quite similar. As the increment in the areas for $t_{ext} \geq 20$ min is minimum, extraction time was limited to this value in the remaining of the work. Analyte recoveries with P100 surpassed those for CAR: from (65 ± 7) times larger for β -pinene to (2.1 ± 0.3) times larger for *trans*-nerolidol. Then, P100 fibers were chosen for the rest of the work.

b) *Screening of the Volatiles from Aromatic Vegetables.* Results obtained in these experiments were generally comparable to analysis of the same samples using the approach traditionally used (steam-assisted distillation of the essential oil from chopped leaves using a Clevenger apparatus and inspection of the distillate by GC-MS). As example, Figure 1 shows one of the chromatograms obtained for *C. martinii* with HS-SPME-GC-MSD. The main constituents for this sample were identified as *trans*-geraniol (80.0% total peak area), geranyl acetate (10.7%) and linalool (3.0%).

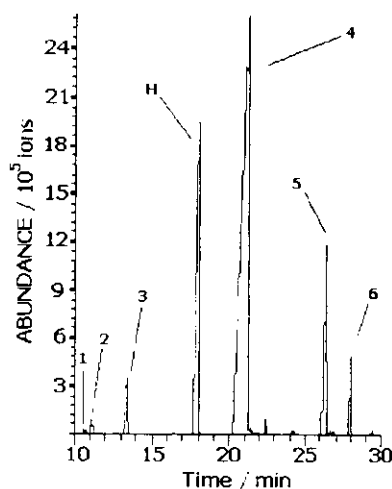


Figure 1. Section of a typical HS-SPME-GC-MSD chromatogram obtained for *C. martinii*. Peaks: 1) α -pinene; 2) *cis*-ocimene; 3) linalool; 4) *trans*-geraniol; 5) geranyl acetate; 6) *trans*-caryophyllene and H) n-alkane (spiked as retention index marker).

4. Conclusions.

The chromatographic profiles here obtained for plant volatiles with HS-SPME-GC are similar to those resulting from the standard Clevenger method. However, time needed to process each sample by SPME is close to 1 h, substantially less than the ~8 h demanded by steam-distillation. Therefore, this HS-SPME method is being considered to be adopted by CPQBA as part of its extensive program on characterization of aromatic and medicinal plants.

Acknowledgements.

This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and by the Fundo de Amparo à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP / Unicamp).

REFERENCES.

1. G. Thodoridis, E.H.M. Koster, C.J. de Jong, J. Chromatogr. B 745 (2000), 49.
2. K.G. Miller, C.F. Poole, T.M.P. Pawlowski, Chromatographia 42 (1994) 639.
3. D.A. Vereen, J.P. McCall, D.J. Butcher, Microchem. J. 65 (2000) 269.
4. C.A. Zini, E. Christensen, E.B. Caramão, F. Augusto, J. Pawliszyn, in press. Anal. Chem., 2001.

ASSESSMENT OF VOLATILE CONSTITUENTS OF SOME BRAZILIAN AROMATIC PLANTS BY HEADSPACE SPME-GC

Adilson Sartoratto ¹ and Fabio Augusto ²

(1) CPQBA and (2) Institute of Chemistry
State University of Campinas (Unicamp); CP 6154 -
13083-970 Campinas – São Paulo, BRAZIL.

 augusto@iqm.unicamp.br

Submitted to the Journal of Chromatography, A
Special Symposium Volume, HTC-7
Brugge, Belgium – February, 2002

1. INTRODUCTION.

Since its introduction [1] Solid Phase Microextraction (SPME) has been extensively applied in the extraction and pre-concentration steps in several analytical methodologies [2]. Its use on the chemical characterization of aromas and fragrances is becoming favored among alternative procedures due to its simplicity, speed, low cost and solventless operation [3]. For example, the use of headspace SPME (HS-SPME) has been reported in several works dealing with chemical analysis of food flavors. Using headspace extractions with 65 μm PDMS / DVB (polydimethylsiloxane / divinylbenzene) SPME fibers, Roberts *et al.* [4] were able to detect and quantify several odorants in prepared coffee, including β -damascenone ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 2,3-diethyl-5-methylpyrazine ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Augusto *et al.* [5] compared several different SPME fibers for characterization of aromas from tropical fruits; the best extraction efficiencies for the target analytes were obtained with Carboxen / PDMS fibers. Other contemporary examples of use of HS-SPME for food aroma analysis include samples such as kiwi [6], cantaloupe [7], wine [8, 9], sugarcane spirit [10] and cheese [11].

Recently, HS-SPME has also been proposed for analysis of aroma and aroma-related biogenic volatile organic compounds (BVOC) released from live vegetables or detached parts of plants. Using HS-SPME with 100 μm PDMS fibers and analysis of the extracts with GC-FID and GC-MS, MacTavish *et al.* [12] determined the BVOC emission profiles from live flowering *Boronia megastigma* plants, identifying compounds such as α -pinene, 5-acetoxylinol, dodecyl acetate and Z-n-heptadec-8-ene in the samples. Other HS-SPME plant VOC studies include species such as Fraser firs (*Abies fraseri*) [13] and eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) [14]. Bicchi *et al.* [15] performed a systematic study comparing different SPME fibers to extract volatile compounds released by powdered aromatic and medicinal plants. Fibers coated with mixed phases, as Carboxen / PDMS and PDMS / DVB, were determined as the most convenient for such procedures. Nonetheless, 100 μm PDMS fibers still are the prevalent for *in vitro* HS-SPME analysis of plant volatiles. Cornu *et al.* [16] detected and identified more than 60 different BVOC (mainly mono- and sesquiterpenoids), released by sliced aerial parts from French natural grassland plants like *Meum athamanticum*, *Pimpinella saxifraga*, *Achillea millefolium*, and *Thymus pulegioides*. HS-SPME also has been helpful in studies such as that performed by Cremer and Eichner [17], on the kinetically and thermodynamic aspects of the production of volatile aroma compounds by paprika (*Capsicum annuum*) during its heating.

In the present work, a general procedure based on HS-SPME coupled to GC-MS and GC-FID for characterization of the volatile fraction from aromatic and medicinal plants will be presented. Qualitative and quantitative data resulting from the application of this method to several plants, natural from or acclimated to Brazil, will be presented.

2. EXPERIMENTAL.

2.1. Materials.

a) Chemicals. Geraniol, geranyl acetate, *cis*-nerolidol, *trans*-nerolidol, α -pinene, β -pinene and limonene with no less than 98 % purity were employed (Sigma, St. Louis, MI and Aldrich, Milwaukee, WI), as well as analytical grade ethanol and sodium chloride (Synth, São Paulo, Brazil) and *n*-alkanes from C₉ to C₂₅ (Sigma and Aldrich). All aqueous solutions were prepared using desionized water generated by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

b) Plant Samples. Leaves from the following aromatic and medicinal vegetable were used: *Aloysia gratissima* (whitebrush or Brazilian lavender), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Mentha spicata* (spearmint or Vilhoça mint), *Mentha piperita* var. *citrata* (peppermint), *Ocimum basilicum* (basil), *Ocimum gratissimum* (clove basil), *Origanum vulgare* (wild marjoran) and *Origanum applii*. Samples were collected from specimens kept on the Experimental Agricultural Field at the CPQBA – Unicamp, finely grinded and stored properly before use.

c) Other Materials. SPME fibers coated with 100 μ m PDMS (P100) and 75 μ m Carboxen / PDMS (CAR / PDMS) and a manual SPME holder were employed (Supelco, Bellefont, PA). For all extractions, samples were kept in 25 mL vials sealed with Teflon / silicone septa (Pierce, Rockford, IL). Fibers were conditioned prior use according to the instructions provided from the supplier.

d) Gas Chromatographs. For the optimization of the extraction method and for quantitative analysis a HP-5890 GC-FID (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), fitted with a 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m HP-5 capillary column (Hewlett-Packard), was employed. The operation temperatures were: injector = 220°C; detector = 250°C and column oven = 2 min at 80°C $\rightarrow$ 3°C $\cdot$ min⁻¹ up to 120°C $\rightarrow$ 7°C $\cdot$ min⁻¹ up to 200°C $\rightarrow$ 7 min at 200°C. Qualitative analysis was performed in a HP-5890 II CG coupled to a HP-5971 Mass Selective Detector and fitted with a 25 m $\times$ 0.20 mm $\times$ 0.33 μ m HP-5 capillary column (Hewlett-Packard). The operational temperatures were: injector = 220°C; detector = 280°C and column oven = 60°C $\rightarrow$ 3°C $\cdot$ min⁻¹ up to 240°C $\rightarrow$ 7 min at 240°C. Chromatographic grade helium (1.0 mL $\cdot$ min⁻¹) was the carrier

gas both for GC-FID and GC-MS. The desorption time was 3 min for all HS-SPME extractions; no carry-over or memory effects were observed in blank runs performed between extractions.

2.2. Methods.

a) Extraction Time and SPME Fiber Selection. The selection of the fiber to be adopted for the further experiments was performed using aqueous solutions containing 1 mg·mL⁻¹ of α - and β -pinene, geraniol, limonene, geranyl acetate, *cis*- and *trans*-nerolidol (expected to be significant components of the plant materials) as test samples. Headspace extractions of 15 mL of these solutions were performed using CAR / PDMS and P100 fibers at 55°C, with sample / headspace equilibration time equal to 30 min (parameters determined in preliminary experiments) and under magnetic stirring (1200 rpm). The solutions also contained NaCl (36% m/v, corresponding to saturated solution), to increase the extraction efficiency. Experiments with extraction times ranging from 10 min to 60 min were carried out with both fibers under evaluation.

b) Repetibility and Reproducibility. The reproducibility and repeatability of this HS-SPME procedure was evaluated through extractions of aqueous solutions of geraniol and geranyl acetate. Experiments using test samples containing 1 mg·mL⁻¹ geraniol and 0.2 mg·mL⁻¹ of geranyl acetate (Solution A) and 0.1 mg·mL⁻¹ geraniol and 0.02 mg·mL⁻¹ of geranyl acetate (Solution B). During 5 consecutive days, these test samples were extracted 5 times per day using the same P100 fiber; extraction time was 20 min and the other parameters were the same as 2.2.a.

c) Screening of BVOC from Aromatic Plants. To identify the volatile components of the plants listed in 2.1.b, 200.0 mg of powdered leaves were suspended in 14.0 mL aqueous saturated NaCl in a sample vial and 1.0 mL of 50 μ g·mL⁻¹ ethanolic solution of the n-alkanes C₉ to C₂₅ (to the evaluation of the retention indexes of the analytes) was added. The headspace of the suspensions were extracted with P100 fibers according to the procedure used in 2.2.b. The extracted materials were immediately desorbed and analysed by GC-MS as described in 2.1.d. Identification of the detected analytes was accomplished by matching their mass spectra with the spectral databases available (NIST-98 and Wiley-198), and confirmed by comparing their retention indexes with literature data [18] and by co-injection of the pure compounds, when available.

d) Quantitation of Selected BVOC. The two major analytes in *C. martinii* – geraniol and geranyl acetate – were quantified using this HS-SPME. Extraction was conducted using the same procedure described in 2.2.b. The corresponding calibration curves were generated extracting aqueous standard solutions of geraniol and geranyl acetate with adequate concentrations. The results were compared to the analysis of the same sample using conventional hydrodistillation: 40.0 g of pulverized sample was suspended in 700 mL desionized water and the essential oil separated after distillation for 3 h in a Clevenger apparatus. The amounts of geraniol and geranyl acetate present in the essential oil were estimated by direct injection of the essential oil, using n-nonane as internal standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

3.1. Selection of Fiber and Extraction Time. Figure 1 shows the extraction time profiles obtained in 2.2.a. To simplify the examination of these profiles, peak areas for each analyte, extraction time and fiber were normalized according to the Equation 1:

$$N = 100 \times \frac{A_{X,t}}{A_{X,10}} \quad (\text{Equation 1})$$

where N is the normalized area. $A_{X,t}$ and $A_{X,10}$ are respectively the peak areas obtained for the analyte with extraction times of t min of 10 min (used as reference).

For the CAR fiber, the areas for geranyl acetate, *cis*- and *trans*-nerolidol are maximized after 20 min extraction. However, there is a significant decrease in areas of the other analytes after 10 min extraction: e.g., for 20 min extraction the limonene peak area is only 63 % of the value observed for 10 min extraction. Then, considering the analytes here tested it is not possible to define a single optimum extraction time for this fiber. For the P100 fiber, areas for geraniol, geranyl acetate, limonene, α - and β -pinene are maximized with 20 min extraction. For *cis*- and *trans*-nerolidol, there is a sharp increase on the extracted efficiency up to 20 min; further increments in the extraction time lead to less pronuntiated area increase.

Inspection of Figure 2 allows comparison of the extraction efficiency of the P100 and CAR fibers. It can be seen that:

- For limonene, α - and β -pinene the differences between the amounts extracted with the tested fibers is higher: the average ratios between the P100 and CAR peak areas for these analytes are respectively (15 ± 4) , (36 ± 4) and (65 ± 7) . These compounds are isomeric

monoterpenes ($C_{10}H_{16}$), and can be assumed as being highly apolar; therefore, their affinity for the non-polar coating of the P100 fiber is also expected to be high.

- For geraniol (a monoterpene, $C_{10}H_{18}O$), its derivative geranyl acetate and for the isomeric sesquiterpenols *cis*- and *trans*-nerolidol ($C_{15}H_{26}O$), the difference between the extraction efficiencies is smaller, although still favorable towards P100. Compared to the monoterpenes above, these compounds are expected to be more polar due to the presence of hydroxyl and carbonyl groups in their structures. The smaller differences between P100 and CAR fibers for isolation of these more polar analytes was expectable, since in the CAR fiber the process responsible for the extraction is, at least in part, adsorption.

Due to its higher extraction capacity towards the tested analytes (which were selected to represent the samples that are expected to be routinely analysed by this methodology), 20 min extraction with P100 fiber was adopted for the further experiments.

3.2. Analysis of Reproducibility and Repeatability. Table 1 lists the results of the systematic evaluation of reproducibility and repeatability described in 2.2.b. For each day, 5 replicate extractions were performed with test solutions containing two different levels of the analytes, and the relative estimates of standard deviations for each analyte, concentration and daily set set of replicates was calculated. Values for s_R ranged from 4.2 % to 9.7 %, which suggests that the precision of the methodology is adequate for quantitative applications. Additionally, these data was submitted to univariate ANOVA analysis [19] (Table 2), to find out if there was dependence of the precision on the day of sampling, analyte nature and level. Both estimated F-test parameters – representing variations on s_R associated to analyte nature and level (1.04) and representing variations on s_R associated to the day of sampling (0.101) – were inferior to the corresponding 95 % significance critical values (3.49 and 3.26, respectively). Therefore, it can be assumed that the precision of the methodology is independent on the nature of the analyte or its level, for the tested substances and concentrations. Also, there was no significant change on the precision during the time span of the experiment. Since the same P100 fiber was employed through all the assays (being applied to ca. 50 headspace extractions during the period, including those used to obtain these data), it can be concluded that did not happen any degradation or alteration on the fiber coating that could affect the precision of the experiments.

3.3. Screening and Quantitation of BVOC from Aromatic Plants. The BVOC found in the inspected vegetable samples are indexed on Table 3; Figures 3 and 4 show HS-SPME-GC-MS chromatograms obtained for *C. martinii* and *A. gratissima*. As can be seen in this table, it was possible to identify most of extracted analytes: for six out of eight evaluated species, the total area of the identified peaks was at least 98 % of the total area; for the other two plants, the sum of the identified peaks was 77.2 % (*A. gratissima*) and 86.7 % (*C. martinii*).

Table 4 compares the concentrations on the major components of *C. martinii* volatile fraction, geraniol and geranyl acetate, found by HS-SPME and hydrodistillation. The amounts found using HS-SPME are not significantly different from those obtained using hydrodistillation. However, the HS-SPME method uses only 0,5 % of the sample amount needed for hydrodistillation. Also, HS-SPME is considerably faster than hydrodistillation (the total extraction time is 50 min, which compares favorably to 3 h needed for hydrodistillation).

4. CONCLUSIONS.

SPME has proved to be a useful tool for the qualitative analysis of the plant BVOC examined in this work, allowing the identification of the main constituents of these samples. PDMS was found to be the most suitable coating for the examined samples, providing higher recoveries than Carboxen-based fibers. This methodology is currently being applied as a routine procedure in several aromatic and medicinal plants studies being conducted at the CPQBA-Unicamp.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was financed by FAPESP (Foundation for Research Support of the State of São Paulo) and FAEP (Fund for Research and Teaching Aid of the State University of Campinas).

REFERENCES.

- [1] C.L. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [2] J. Pawliszyn (editor), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, London, 1999.
- [3] A. Sides, K. Robards and S. Helliwell, *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 322.
- [4] D.D. Roberts, P. Pollien and C. Milo, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 2430.
- [5] F. Augusto, A.L.P. Valente, E.S. Tada and S.R. Rivellino, *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 117.
- [6] X.M. Wan, R.J. Stevenson, X.D. Chen and L.D. Melton, *Food Res. Int.*, 32 (1999) 175.
- [7] B. Ancos, E. Ibanez, G. Reglero and M.P. Cano, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 873.
- [8] C. Sala, M. Mestres, M.P. Marti, O. Busto and J. Guasch, *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 93.
- [9] J. Weber, M. Beeg, C. Bartsch, K.H. Feller, D.D. Garcia, M. Reichenbacher and K. Danzer, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 22 (1999) 322.
- [10] E.A. Nonato, F. Carazza, F.C. Silva, C.R. Carvalho and Z.L. Cardeal, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 3533.
- [11] C. Pérès, C. Viallon, J.L. Berdagué, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1030.
- [12] H. S. MacTavish, N.W. Davies and R.C. Menary, *Ann. Bot.*, 82 (2000) 347.
- [13] D.A. Vereen, J.P. McCall and D.J. Butcher, *Microchem. J.*, 65 (2000) 269.
- [14] C.A. Zini, F. Augusto, E. Christensen, B.P. Smith, E.B. Caramão and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4729.
- [15] C. Bicchi, S. Drigo and P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 469.
- [16] A. Comu, A.P. Carnat, B. Martin, J.B. Coulon, J.L. Lamaison and J.L. Berdagué, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 203.
- [17] D.R. Cremer and K. Eichner, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 2454.
- [18] R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry*, Allured, Carol Stream, 1995.
- [19] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, London, 1993, section 3.8.

TABLES

Table 1. Estimates of relative standard deviation, s_R (%), obtained for geraniol and geranyl acetate peak areas.

	Analyte	s_R % (a)				
		Day #1	Day #2	Day #3	Day #4	Day #5
Solution A (b)	Geraniol	8.3	8.6	9.5	8.4	7.4
	geranyl acetate	9.2	4.5	9.8	7.0	8.6
Solution B	Geraniol	7.4	8.9	6.8	9.7	9.2
	geranyl acetate	6.0	8.5	4.7	7.0	7.9

Notes:

(a) Five replicate extractions per day.

(b) Solution A: 1 mg·mL⁻¹ geraniol and 0.2 mg·mL⁻¹ of geranyl acetate; Solution B: 0.1 mg·mL⁻¹ geraniol and 0.02 mg·mL⁻¹ of geranyl acetate.

Table 2. ANOVA analysis of the estimates of relative standard deviation from Table 1.

Source of Variation ↓	SS (a)	v	MS	F	F ⁹⁵
Analyte & Concentration	8,82	3	2,94	1,04	3,49
Day	1,14	4	0,286	0,101	3,26
Error	34,0	12	2,83		
Total	43,9	19			

Note:

(a) **SS** = sum of squares; **v** = degrees of freedom; **MS** = mean square; **F** = F-test parameter and **F⁹⁵** = 95 % significance critical value for the F-test parameter.

Table 3. BVOC identified after HS-SPME-GC-MS analysis of aromatic plants.
 AG = *A. gratissima*; CM = *C. martinii*; MP = *M. piperita*; MS = *M. spicata*; OV = *O. vulgare*;
 OA = *O. applii*; OB = *O. basilicum* and OG = *O. gratissimum*.

Analyte	RI (a)	Sample (b)							
		AG	CM	MP	MS	OV	OA	OB	OG
α -pinene	934	0.18							
1-octen-3-ol	978					0.68			
β -pinene	979	3.65							
β -mircene	991	1.07							
3-octanol	998			10.09					
<i>p</i> -cimene	1024					1.50			
limonene	1028	1.80							
1,8-cineol	1031							1.05	
<i>trans</i> - β -ocimene	1035					0.39			
<i>cis</i> - β -ocimene	1043	0.67	0.73						
γ -terpinene	1057					1.99			
isopentyl n-butyrate	1068			0.67					
α -terpinolene	1083	0.18				0.31			
fenchone	1088							0.53	
Linalool	1093	2.15	4.10	51.03			4.92	32.58	
<i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol	1122			0.52		1.47			
<i>trans</i> -pinocarveol	1136	1.77							
<i>trans-p</i> -menth-2-en-1-ol	1140					0.86			
camphor	1150							10.08	
<i>trans</i> -pinocamphone	1161	10.86							
borneol	1169					2.52			
<i>cis</i> -pinocamphone	1173	4.02							
terpin-4-ol	1176			8.00		33.33	3.08	0.99	0.26
cimen-8-ol	1182	0.23					0.64		
α -terpineol	1188	0.27		1.31		4.25		3.90	
<i>trans</i> -piperitol	1208					0.16			
<i>trans</i> -carveol	1216	0.22							
thimol methyl ether	1231					0.24	1.47		
carvacrol methyl ether	1241					1.33	5.91		
carvone	1241	0.12		23.42					
<i>trans</i> -geraniol	1262		68.18						
bornyl acetate	1282	0.51				0.20			
thimol	1294					37.99	64.52		
<i>trans</i> -pinocarveyl acetate	1303	9.27							
eugenol	1358							28.09	93.94
piperitenone oxide	1373				94.79				
α -copaene	1378	0.15							
geranyl acetate	1379		10.29			0.33			
β -bourbonene	1385	0.31		0.18			1.35	0.23	
β -elemene	1393	1.19						1.92	
methyleugenol	1405	0.19							
<i>trans</i> -caryophyllene	1422	5.95	2.31	2.31		2.66		2.00	1.08
β -gurjunene	1430						0.36		
β -bergamotene	1435							1.66	
γ -elemene	1437	2.18							

Table 3 (cont.)

Analyte	RI (a)	Sample (b)							
		AG	CM	MP	MS	OV	OA	OB	OG
α -guaiene	1438							0.29	
β -farnesene	1454				0.76				
α -humulene	1455	2.65						0.77	
<i>allo</i> -aromadendrene	1461						0.28		
germacrene D	1482	4.56		0.44		1.47	4.79	5.49	4.23
γ -muurolene	1484				1.06				
δ -guaiene	1506							0.68	
β -bisabolene	1508					1.05	1.98		
γ -cadinene	1516						0.89	1.27	
δ -cadinene	1524	0.40						0.29	0.19
elemol	1555	2.31							
germacrene B	1564	2.95							
espatulenol	1580	1.63				1.44	1.62		
caryophyllene oxide	1586	2.49				1.07			
unknown, MW = 222	1607	9.19							
<i>epi</i> - α -muurolol	1643						0.72	5.81	
α -eudesmol	1655							0.24	
α -cadinol	1656					0.29	1.53	0.38	0.16
unknown, MW = 222	1678	4.12							
<i>cis</i> -farnesol	1724		1.10						
SUM OF IDENTIFIED PEAKS		77.2	86.7	98.0	96.6	95.5	94.1	98.3	99.9

Notes:

(a) RI = retention index.

(b) Results expressed as % Area.

Table 4. Comparison of hydrodistillation and HS-SPME for quantitation of the major BVOC on *C. martinii*.

BVOC	HDS	HS-SPME
geraniol	0.65 %	0.75 %
geranyl acetate	0.06 %	0.05 %

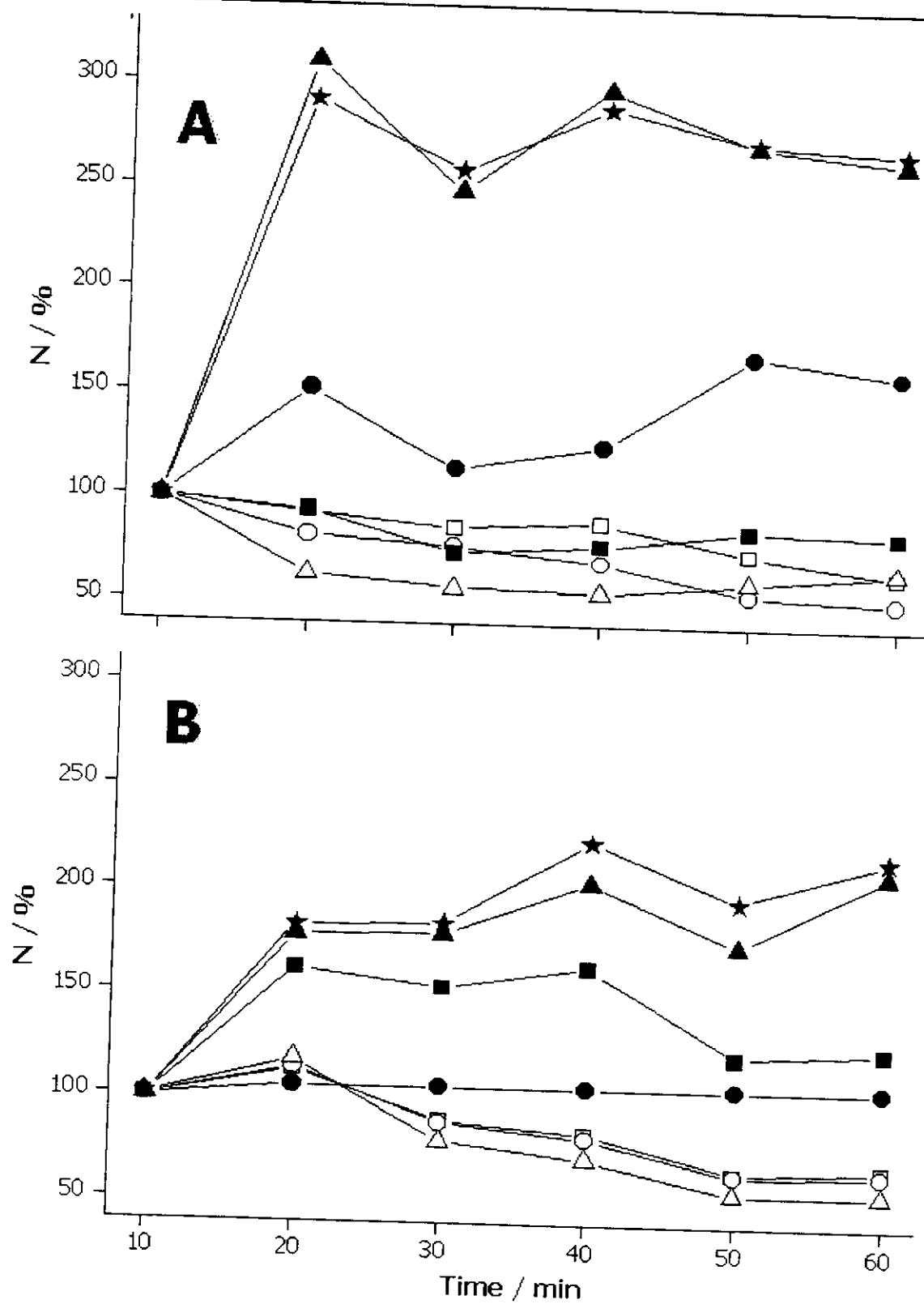
CAPTIONS FOR FIGURES

Figure 1. HS-SPME extraction profiles for CAR (A) and P100 (B) fibers. Analytes: $\square$ = α -pinene; $\circ$ = β -pinene; Δ = limonene; $\blacksquare$ = geraniol; $\bullet$ = geranyl acetate; $\blacktriangle$ = *cis*-nerolidol and $\star$ = *trans*-nerolidol.

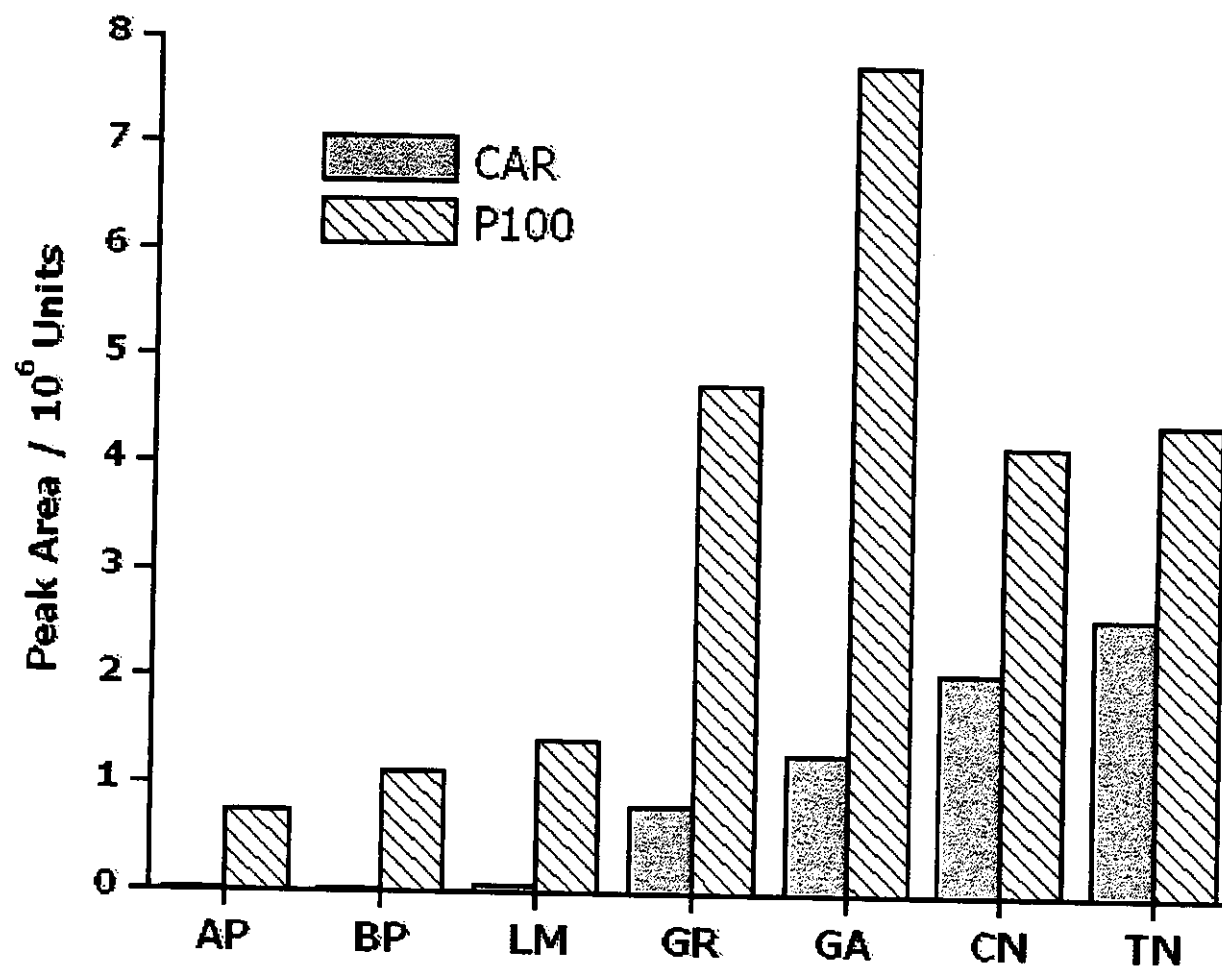
Figure 2. Peak areas with 20 min extraction for α -pinene (AP), β -pinene (BP), limonene (LM), geraniol (GR), geranyl acetate (GA), *cis*-nerolidol (CN) and *trans*-nerolidol (TN).

Figure 3. Section of a typical HS-SPME-GC-MS chromatogram for *C. martinii* (palmarosa). Peaks: 1 = β -ocimene; 2 = linalool; 3 = geraniol; 4 = geranyl acetate; 5 = *trans*-caryophyllene and 6 = *cis*-farnesol; C_9 and C_{12} = *n*-alkanes (RI markers).

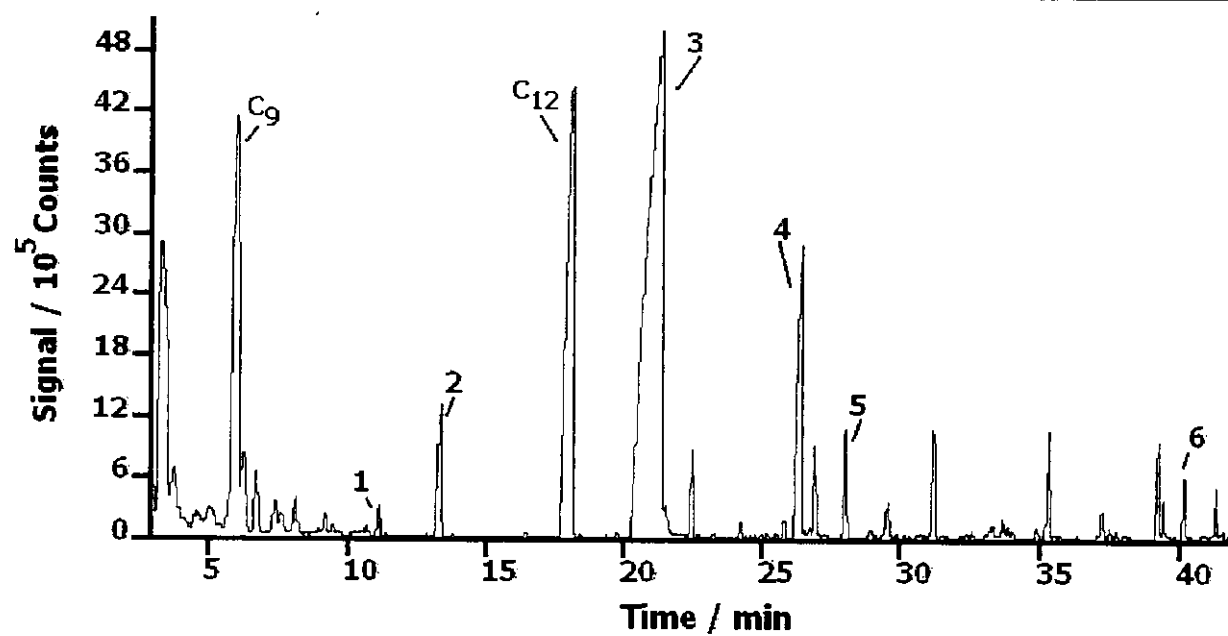
Figure 4. Section of a typical HS-SPME-GC-MS chromatogram for *A. gratissima* (Brazilian lavender). Peaks: 1 = β -pinene; 2 = linalool; 3 = *trans*-pinocamphene; 4 = *trans*-pinocarveyl acetate; 5 = *trans*-caryophyllene; 6 = germacrene D and 7 = germacrene B; C_9 , C_{12} and C_{12} = *n*-alkanes (RI markers).



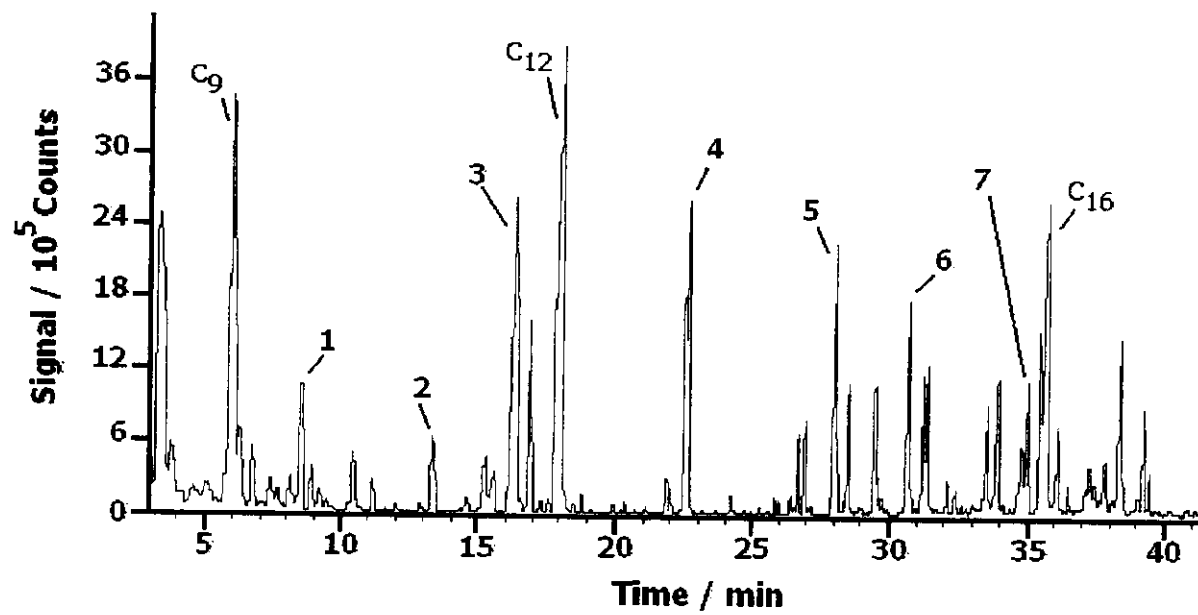
(FIGURE 1)



(FIGURE 2)



(FIGURE 3)



(FIGURE 4)

Isolamento e identificação de constituintes do óleo essencial de *Aloysia gratissima* por SPME-GC-MS.

Adilson Sartoratto (PG)^{1*} e Fábio Augusto (PQ)²

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA (1) e Instituto de Química (2) – Unicamp. *adilson@cpqba.unicamp.br

Palavras Chave: SPME; GC-MS; óleos essenciais; análise qualitativa.

Introdução

A Micro-Extração em Fase Sólida (SPME, *Solid Phase Micro-Extraction*) é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes e manipulação excessiva de amostra, introduzida no início da década de 90¹. O seu princípio básico é simples: uma fibra de sílica coberta com um filme de material sorvente é exposta à amostra ou ao seu *headspace*. Os analitos contidos na amostra são sorvidos na camada de recobrimento da fibra, que é posteriormente recolhida e introduzida diretamente no injetor aquecido de um cromatógrafo gasoso. Por sua vez, os analitos coletados são dessorvidos termicamente no injetor e arrastados para a coluna cromatográfica.

Material e Métodos

Folhas de *A. gratissima* cultivada no CPQBA-Unicamp foram cortadas finamente, homogeneizadas e transferidas para um frasco contendo solução saturada de NaCl, e o mesmo lacrado com septo de silicone. O frasco foi colocado por um período de tempo definido em um banho termostaticado. Uma fibra de SPME recoberta com 75 µm de Carboxen-PDMS foi então exposta ao *headspace* da solução, sendo extraídos os constituintes voláteis, que foram separados e identificados em um cromatógrafo gasoso HP-5890 Série II com detector seletivo de massas HP-5971 e coluna capilar HP-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 µm). Temperaturas: injetor = 220°C, detector = 280°C, coluna = 60°C (2 min), 3°C.min⁻¹, 120°C, 10°C.min⁻¹, 200°C (7 min). Injeção no modo *splitless* durante a dessorção. Vazão do gás de arraste = 1,0 mL.min⁻¹. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Resultados e Discussão

Através de planejamento experimental quimiométrico, foram obtidos valores otimizados para os parâmetros utilizados na extração por SPME (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros utilizados na análise por SPME do óleo essencial de *A. gratissima*.

Parâmetros	Valores
Temperatura do banho	55°C
Tempo de equilíbrio solução/headspace	30 min.
Tempo de exposição da fibra	20 min.
Força iônica	36%

Figura 1. Cromatograma da análise por SPME de *A. gratissima*.

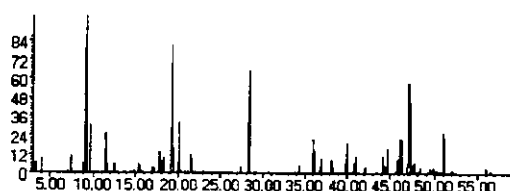


Tabela 2. Constituintes do óleo essencial de *A. gratissima*

t _R (min)	Composto	Área %
7,413	α-pineno	0,684
9,013	sabineno	0,423
9,195	β-pineno	9,247
9,728	β-mirceno	2,321
11,600	limoneno	2,341
19,343	2,6,6-trimetilbicyclo-heptan-3-ona	12,801
34,330	elemeno	0,503
36,066	trans-cariofileno	3,048
36,975	γ-elemeno	1,097
39,959	β-cubebeno	2,576
44,590	germacreno B	2,311
47,147	guaíol	9,727

Conclusões

SPME mostrou-se muito conveniente para a identificação dos componentes do óleo de *A. gratissima*. Dada a sua simplicidade e rapidez, a técnica é bastante apropriada para a análise de óleos essenciais. Deve-se observar que a suspensão das folhas em solução saturada de NaCl é fundamental para uma extração eficiente dos seus constituintes voláteis.

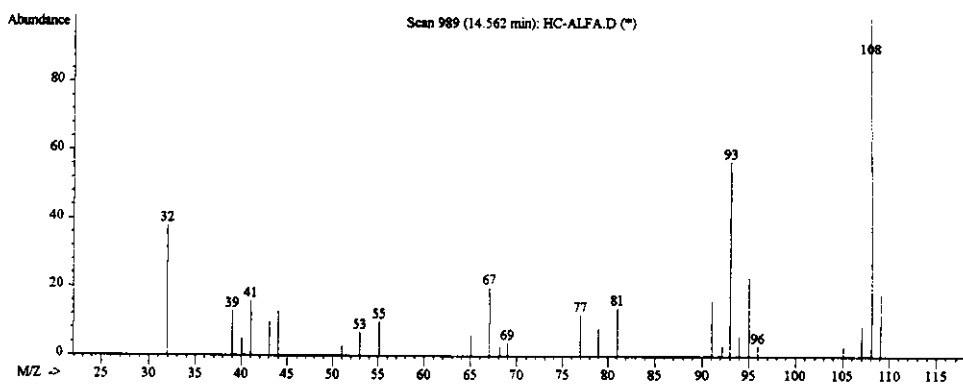
Agradecimentos

Financiado pelo FAEP/Unicamp e pela FAPESP.

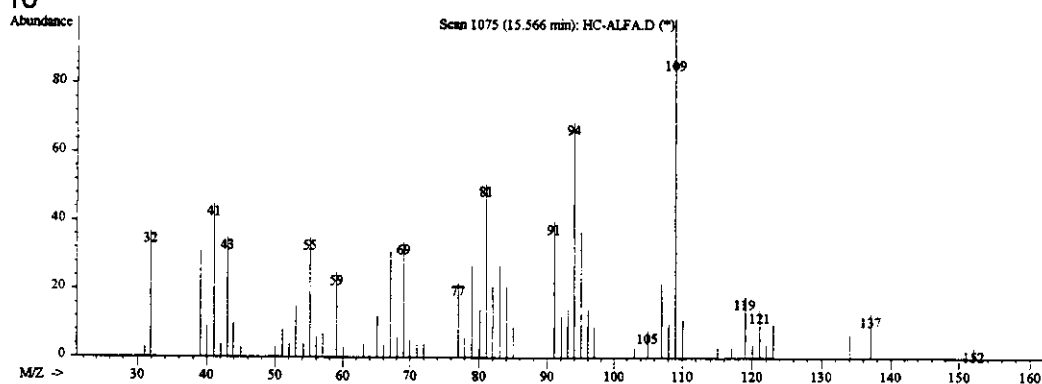
¹ Pawliszyn, J.; *Solid Phase Microextraction – Theory and Practice*, Wiley-VCH, Inc, 247 pag, 1997

ESPECTROS DE MASSA DOS ANALITOS NÃO IDENTIFICADOS1) *Aloysia gratissima*

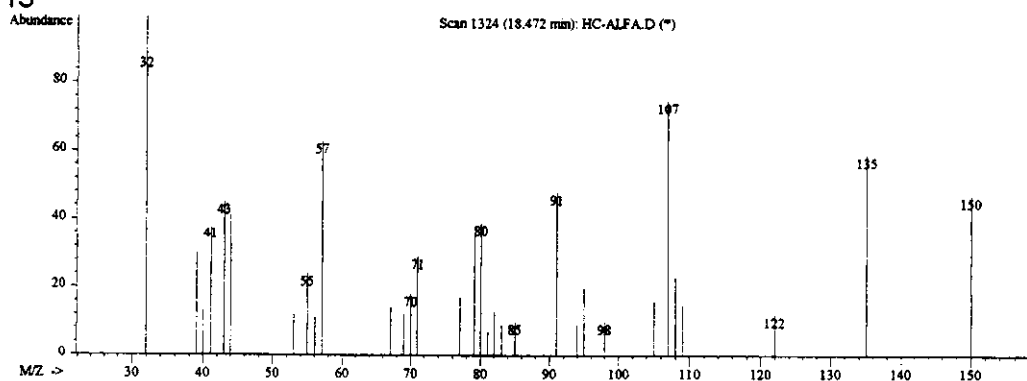
Composto 8



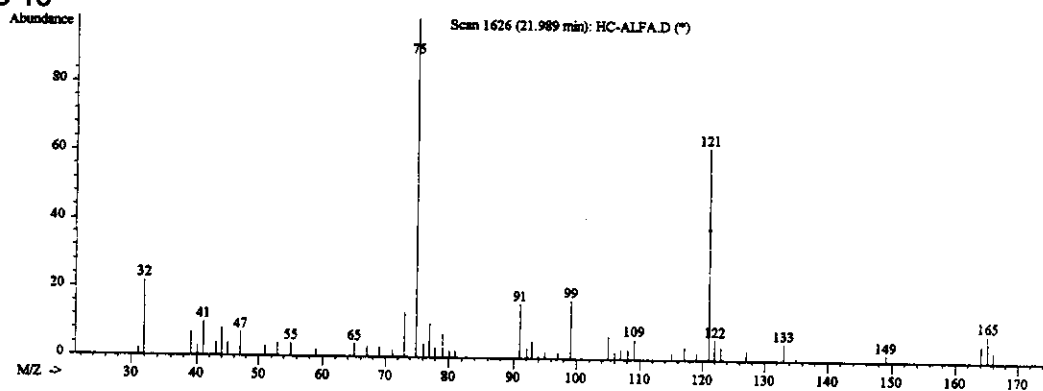
Composto 10



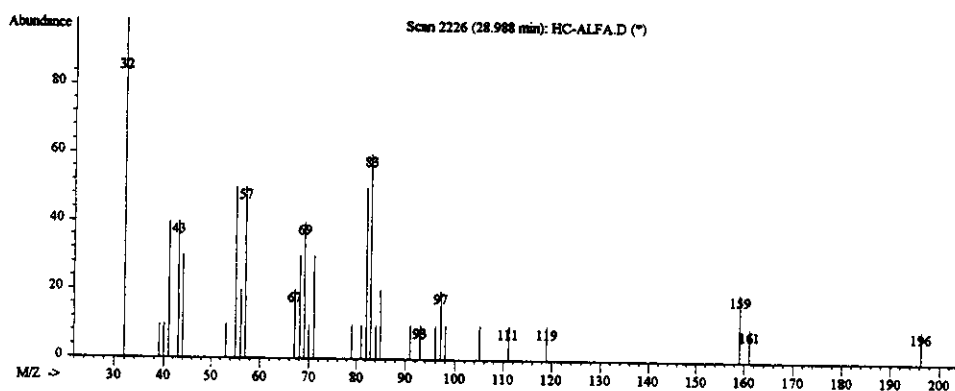
Composto 15



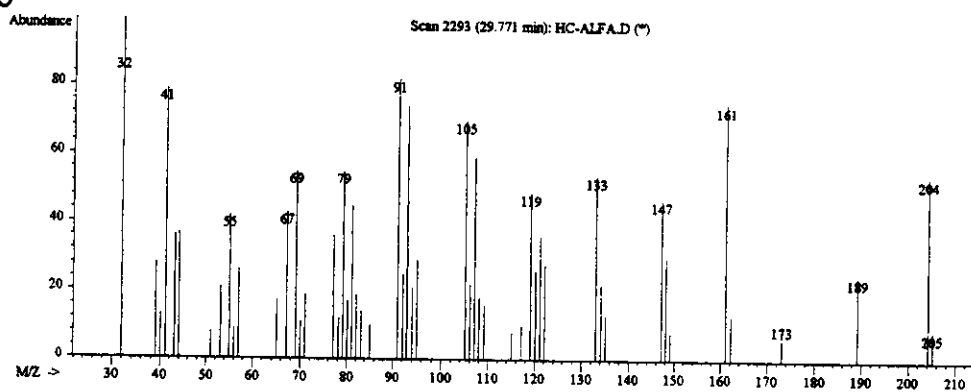
Composto 19



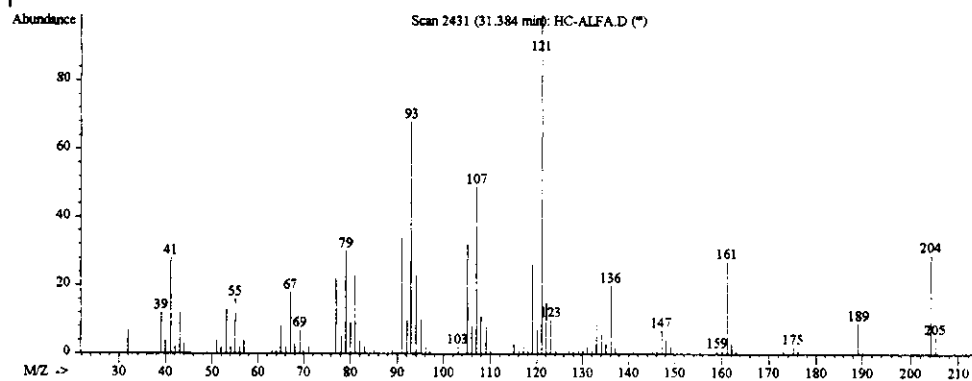
Composto 27



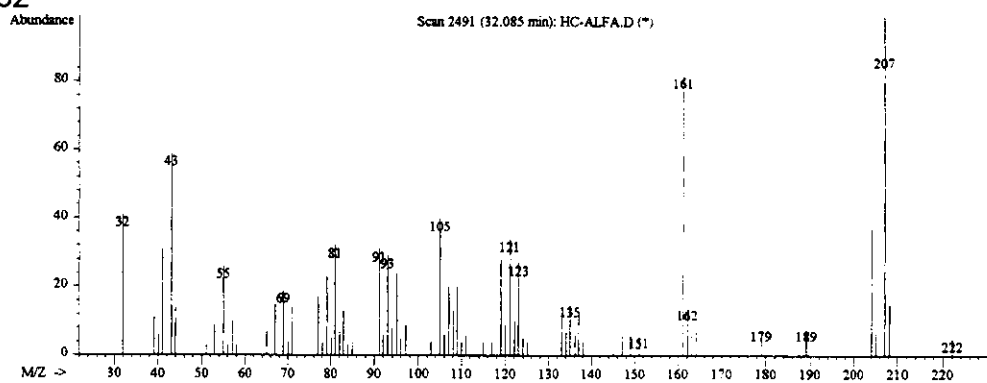
Composto 29



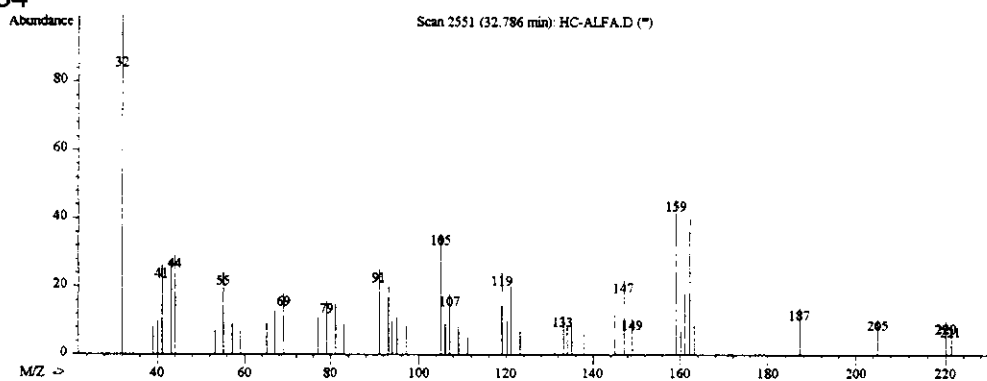
Composto 31



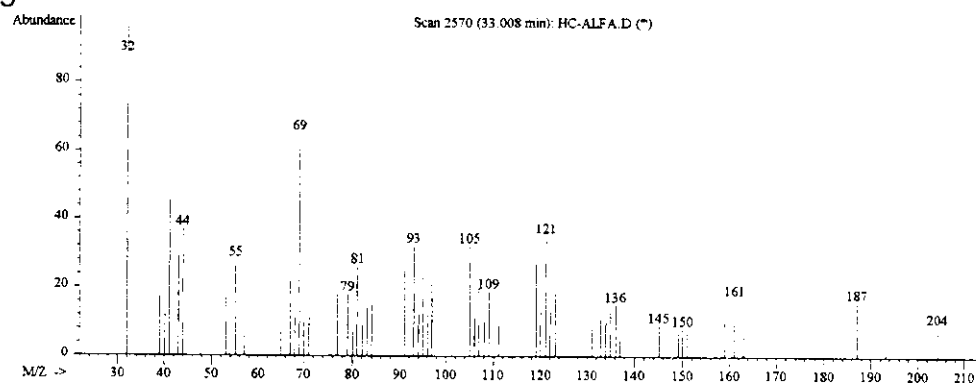
Composto 32



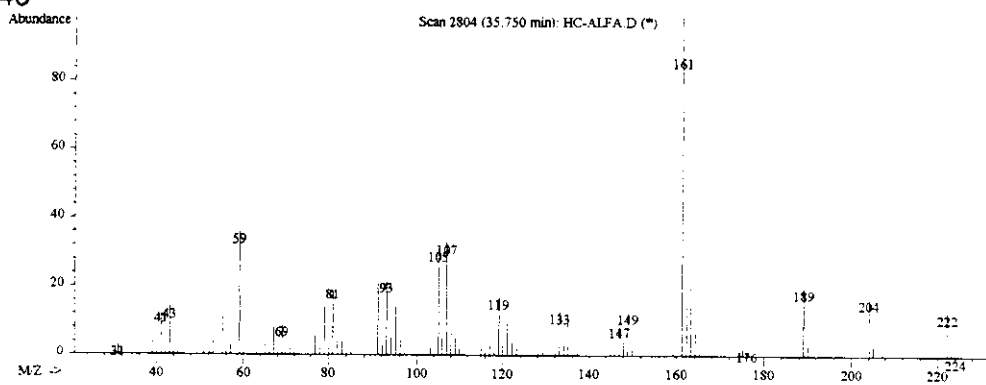
Composto 34



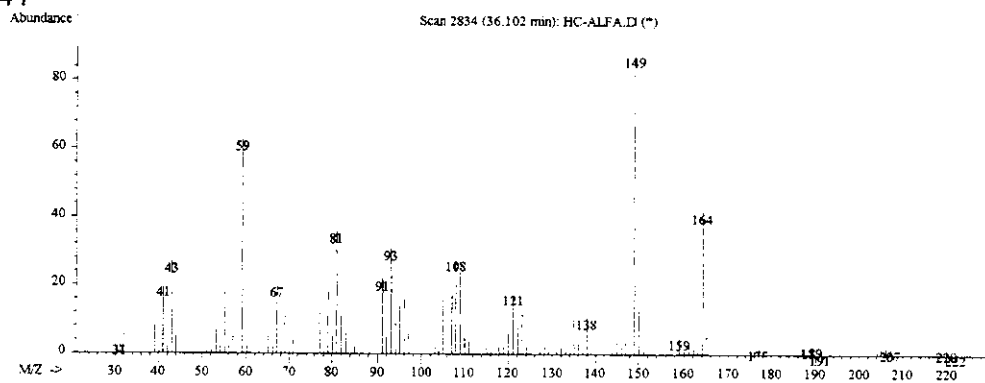
Composto 35



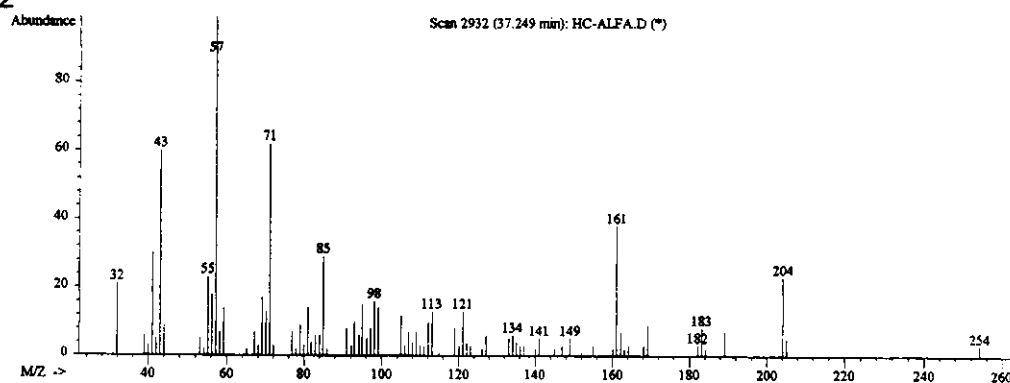
Composto 40



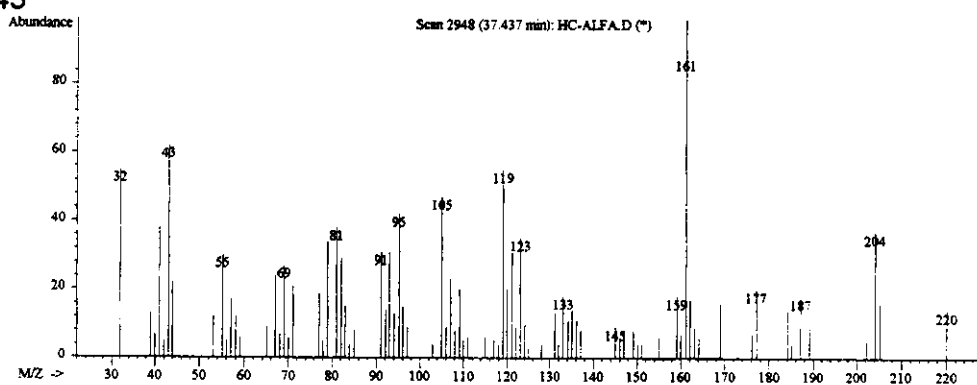
Composto 41



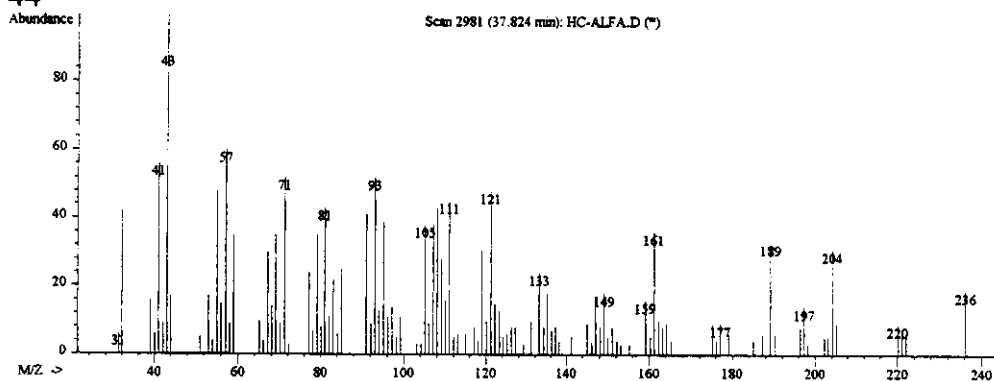
Composto 42



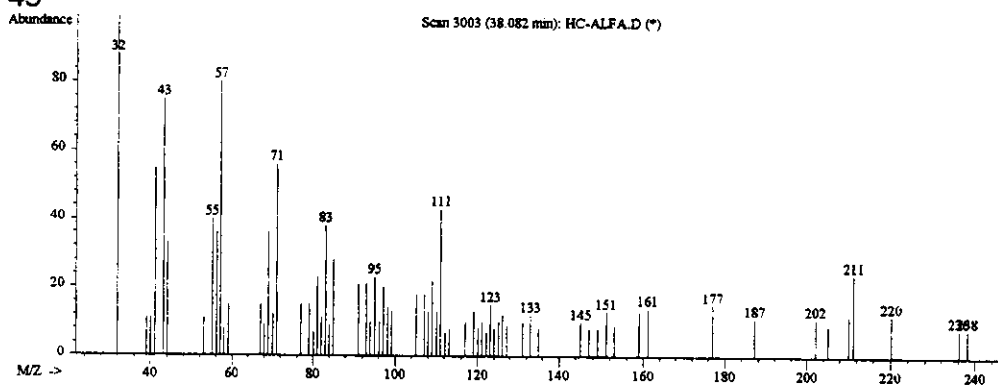
Composto 43



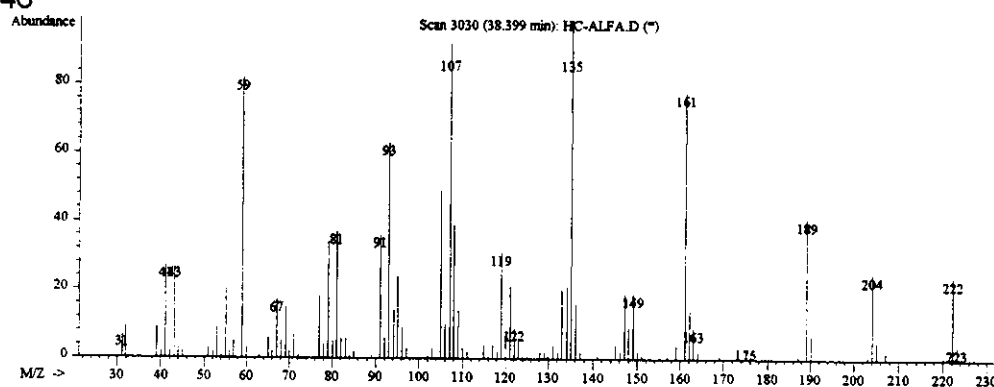
Composto 44



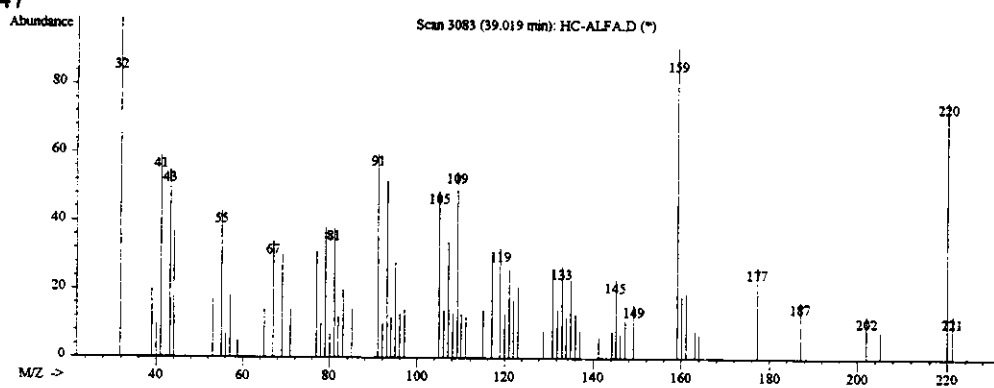
Composto 45



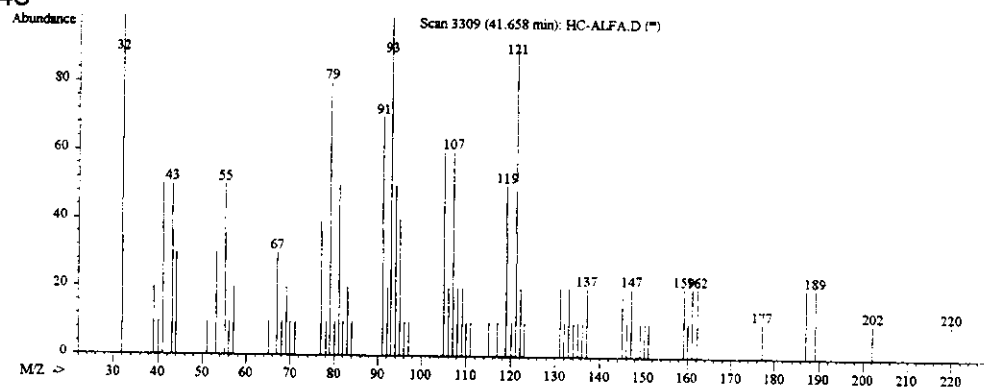
Composto 46



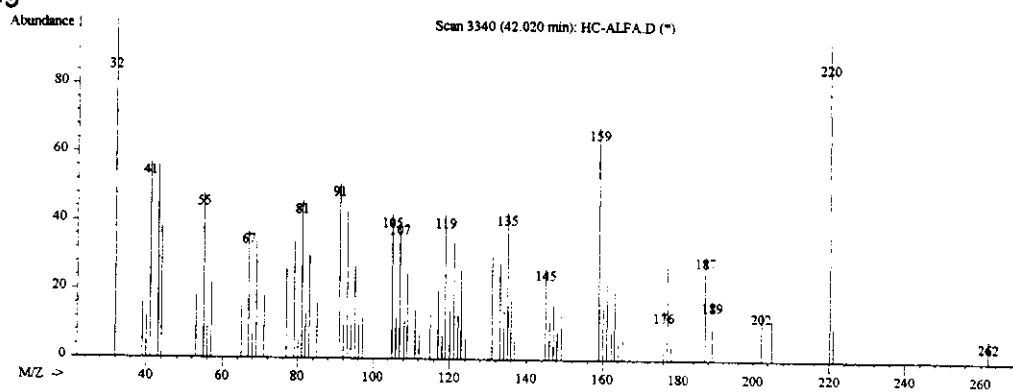
Composto 47



Composto 48

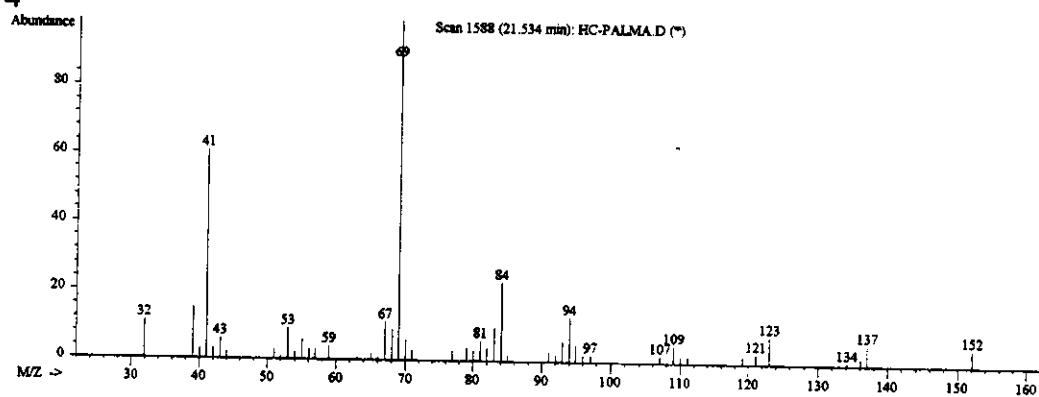


Composto 49

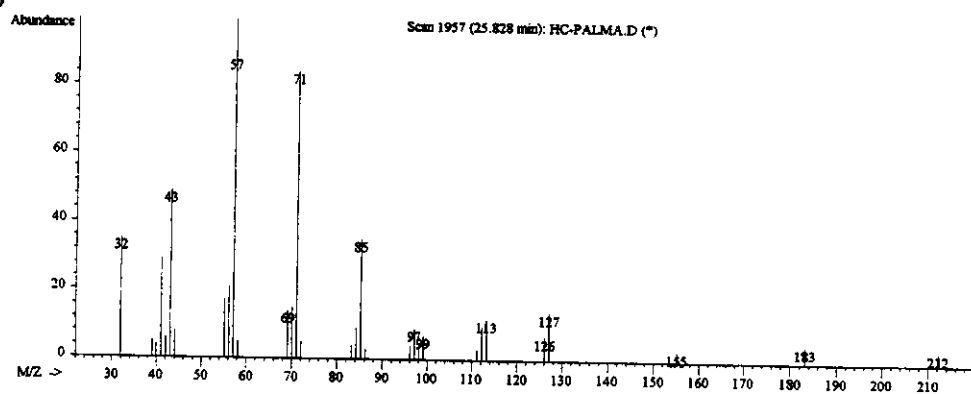


2) *Cymbopogon martinii*

Composto 4

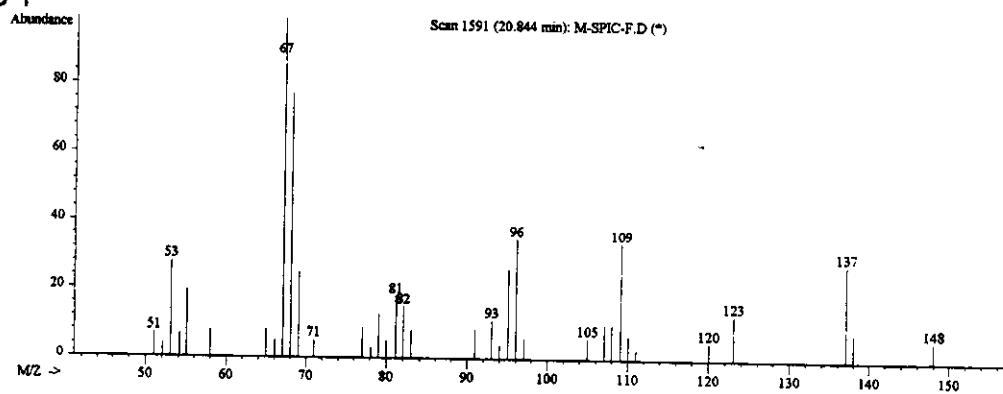


Composto 5

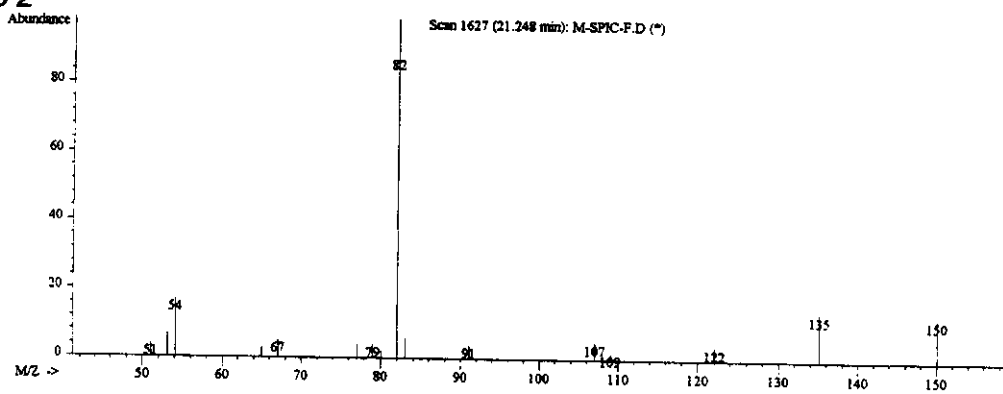


3) *Mentha spicata*

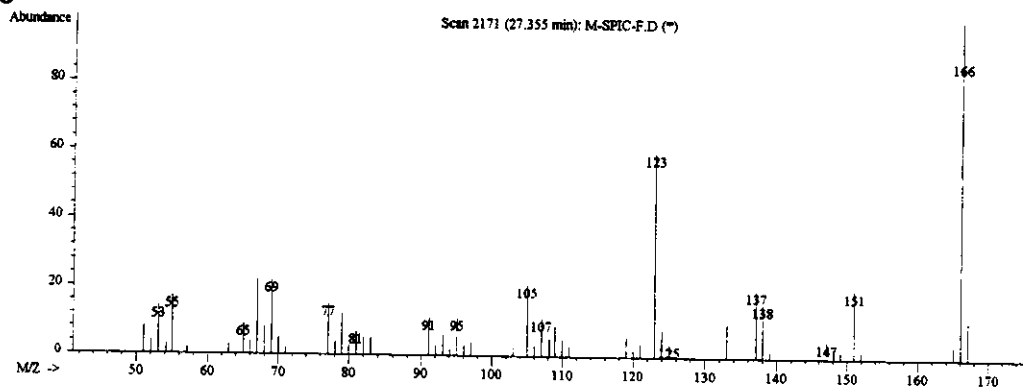
Composto 1



Composto 2

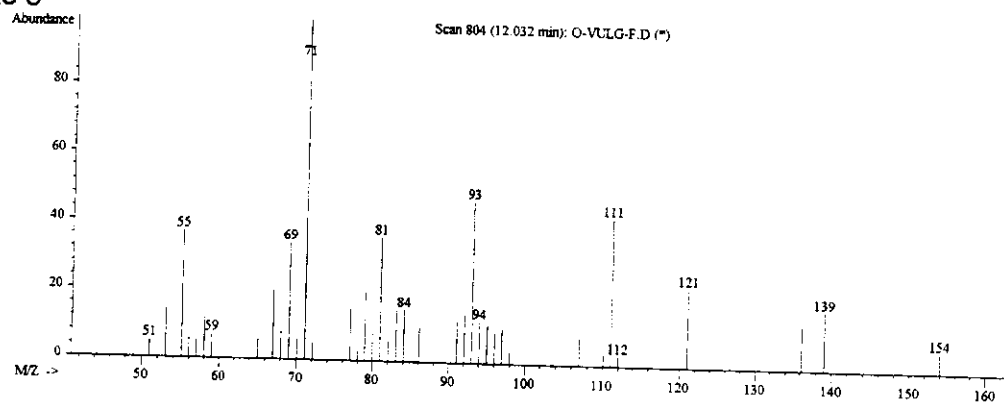


Composto 5



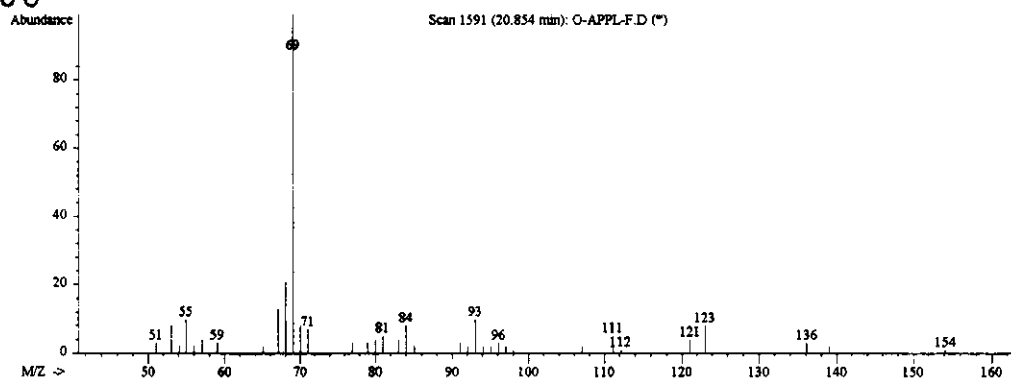
4) *Origanum vulgare*

Composto 5

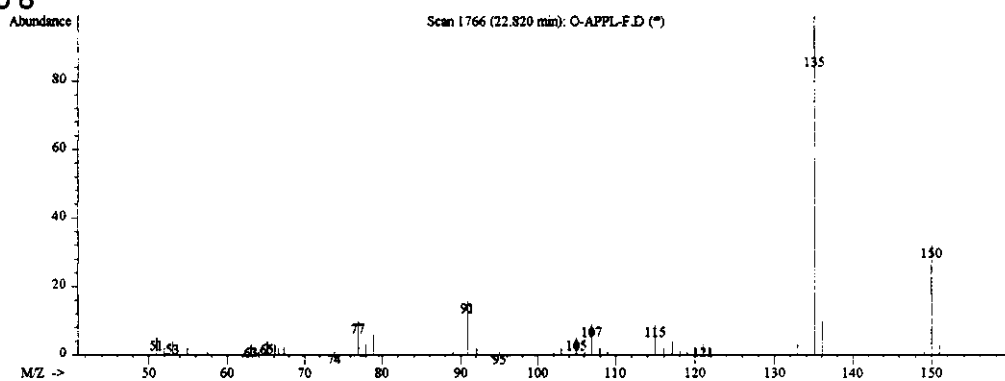


5) *Origanum applii*

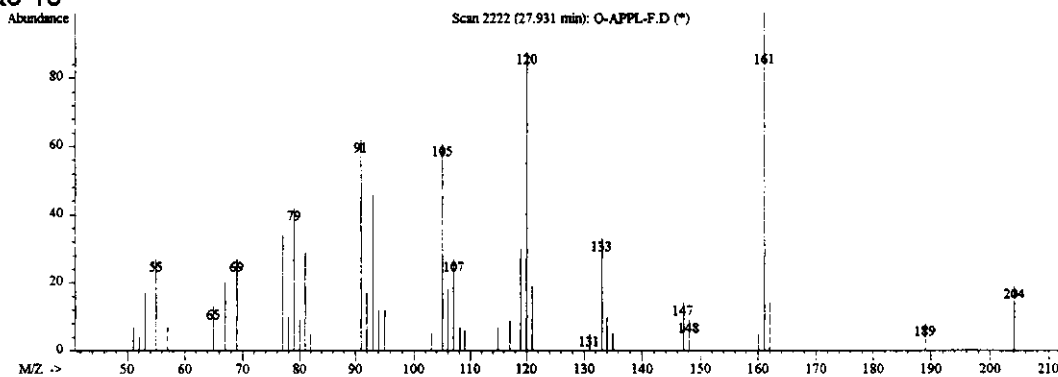
Composto 6



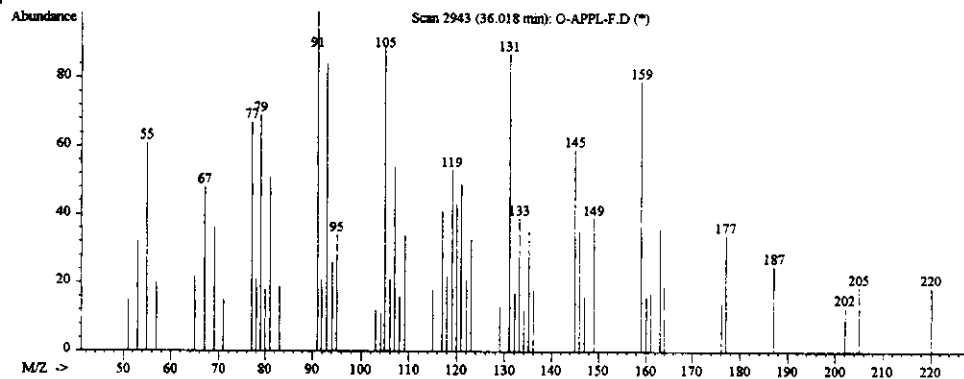
Composto 8



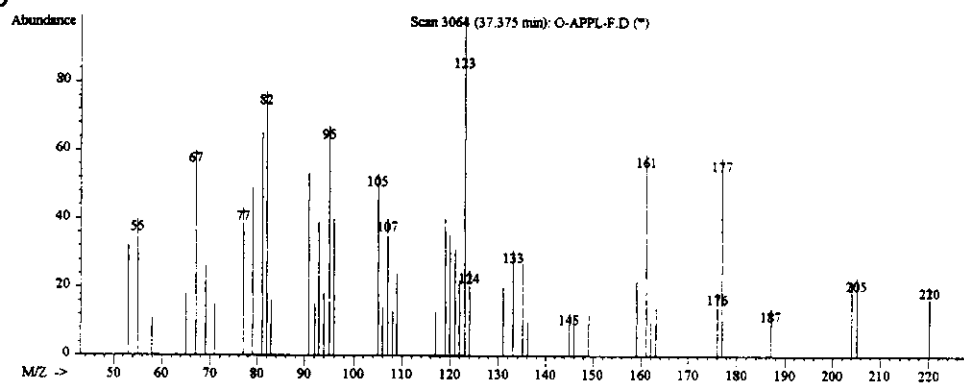
Composto 10



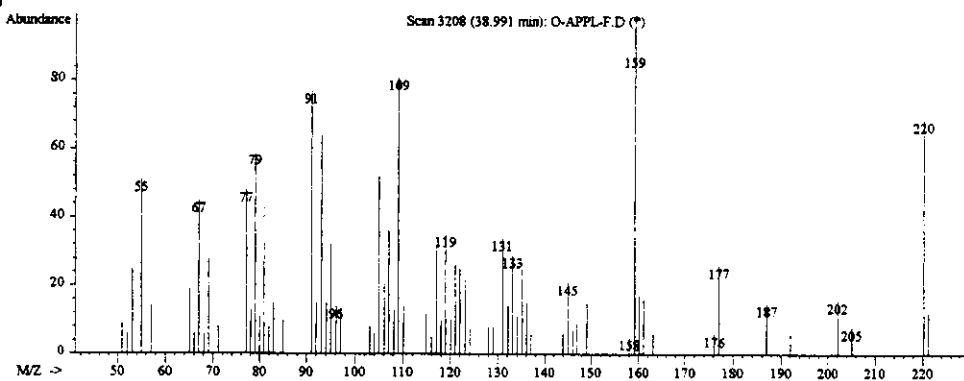
Composto 17



Composto 19

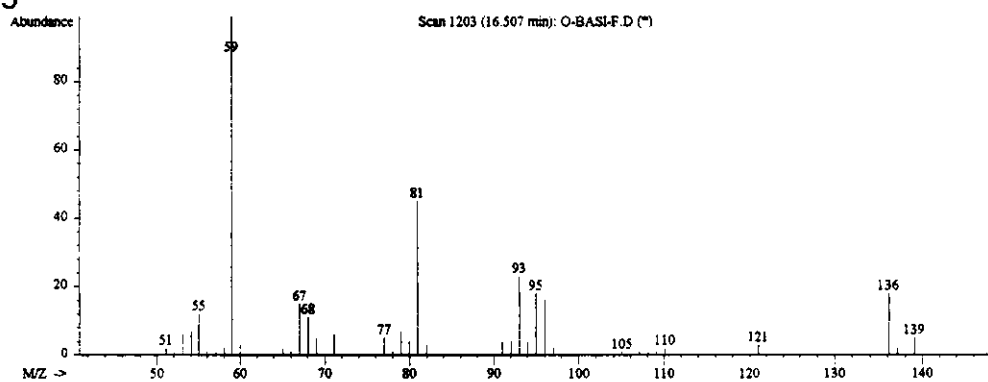


Composto 21

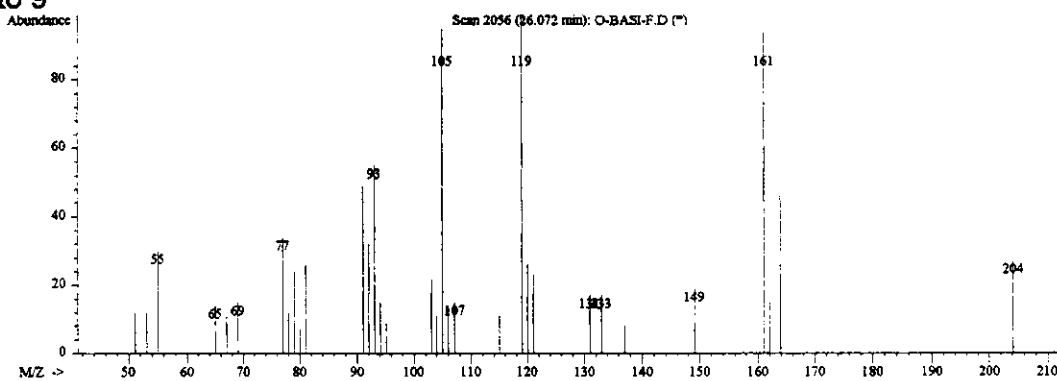


6) *Ocimum basilicum*

Composto 5



Composto 9



Composto 20

