



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia

FEUP



Salomé de Sousa Teixeira

Determinação de Compostos Orgânicos de Grande Valor Comercial em Extractos Vegetais - Estudo de Novas Técnicas de Extracção



Universidade do Porto
FEUP Faculdade de
Engenharia

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Determinação de Compostos Orgânicos de Grande Valor
Comercial em Extractos de Espécies Vegetais – Estudo de Novas
Técnicas de Extração

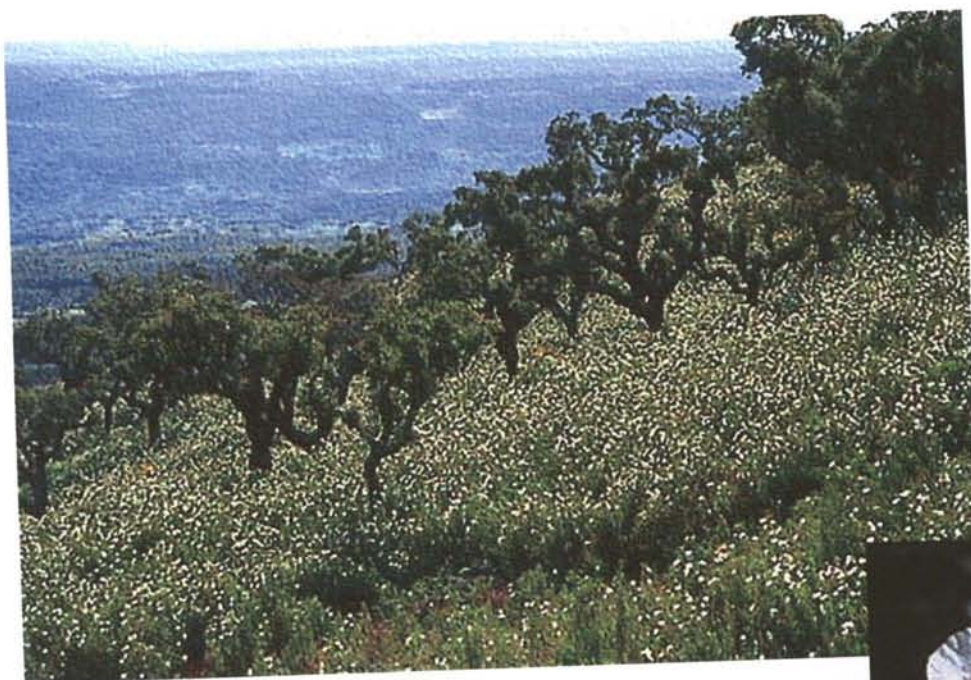
Salomé de Sousa Teixeira

Licenciada em Engenharia Química pelo
Instituto Superior de Engenharia Química do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial
dos requisitos do grau de mestre em
Engenharia do Ambiente
(Ramo de Tratamento de Águas e Águas Residuais)

Dissertação realizada sob a supervisão da Professora Doutora Lúcia Santos
e co-supervisão do Professor Doutor Adélio Mendes
do Departamento de Engenharia Química
da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Porto, 2003



○ Esteval, *Cistus ladanifer* L.



"À medida que descem a encosta
o pinhal vai-se dispersando, as árvores inclinam-se
na mesma direcção (a marca do vento, deduz Elias) e o
mato rasteiro ganha terreno (o vento ainda, a viagem das sementes)
urze e estevais por toda a parte. Mais uns passos e abrange-se o horizonte até ao mar.

....

Estevais é o que há à volta deles, estevais e pedras, ausência de árvores. E sol.
O sol a rebrilhar no verniz das folhas das estevas e o cheiro morno que elas deitam..."

José Cardoso Pires, *Balada da Praia dos Cães*

Agradecimentos

Começo por expressar o meu sincero agradecimento, à minha orientadora, a Professora Doutora Lúcia Santos, pelos conhecimentos prestados, apoio e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo deste trabalho. Não poderia deixar de reconhecer e agradecer todo o precioso auxílio que me concedeu mas também a preocupação e compreensão demonstradas durante as fases mais difíceis deste projecto.

Ao Professor Doutor Adélio Mendes não podia deixar de dedicar uma palavra de gratidão pela disponibilidade e entusiasmo que sempre demonstrou pelo projecto "Esteva".

Agradeço ainda, à Professora Doutora Arminda Alves as valiosas críticas e sugestões que me concedeu durante a elaboração deste texto, bem como a disponibilidade e ensinamentos prestados.

Não poderia ainda, deixar de agradecer a ajuda e colaboração que me foram concedidas pelos Técnicos Senhor Serafim e Fátima Ferreira, pelos colegas, Ana Sílvia Cortesão, Eduardo Agra e João Cruz. Aos colegas Ana Luísa Ferreira e António Ribeiro, agradeço, em especial, a ajuda prestada na recolha de amostras de Esteva.

Às colegas do laboratório "vizinho", Rosa Rego, Sara Pontes e Lúcia Brandão o meu agradecimento pela ajuda e amizade demonstradas.

Desejo, também aqui expressar a minha maior gratidão aos colegas Elsa Costa, Joana Teixeira, Manuela Correia, Nuno Ratola, Paulo Herbert, Susana Varandas e Zé Luís Moreira, pelo prazer que foi conviver e trabalhar com eles. O excelente ambiente de trabalho e companheirismo que me proporcionaram foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, desejo agradecer os meios e facilidades concedidas para a execução deste projecto.

Finalmente, o meu agradecimento a todos aqueles que embora aqui não mencionados contribuíram para a realização desta tese.

Resumo

O presente trabalho surge do reconhecimento das potencialidades naturais da flora portuguesa, particularmente rica em espécies aromáticas, e da necessidade de preservação e desenvolvimento dos espaços florestais. Acreditando que a melhor forma de o conseguir será promovendo a valorização destes recursos naturais, procurou-se, deste modo, obter extractos (óleo essencial) da espécie vegetal Esteva (*Cistus ladanifer* L.) e proceder à sua caracterização tendo como objectivo a identificação e quantificação, nestes, de compostos de elevado valor comercial.

Planta nativa e muito frequente em território nacional, a Esteva exsuda uma resina, designada por lábdano, que tem sido extraída quer por destilação quer por extracção com solventes em países como Espanha e França. Os produtos obtidos são particularmente apreciados pelo seu odor balsâmico, mas principalmente pelas excelentes propriedades fixativas que possuem.

Dos produtos sintetizados pelas plantas, os óleos essenciais estão entre os mais valiosos, encontrando grande aplicabilidade comercial, em particular pelas suas características odoríficas de que os compostos terpénicos oxigenados são os principais responsáveis. Deste modo, a identificação e quantificação nos extractos de Esteva da presença dos álcoois monoterpénicos linalol, borneol, α -terpineol, citronelol e geraniol, dos acetatos de bornilo e geraniol e ainda do fenilpropanóide eugenol, representaram um dos principais objectivos do presente trabalho. Foram ainda incluídos neste conjunto de compostos de interesse o α -pineno e a 2,2,6-trimetilciclohexanona, identificados em diversos estudos como constituintes maioritários do óleo essencial de Esteva.

A complexidade apresentada pela generalidade dos óleos essenciais, formados por misturas de substâncias de classes químicas e pesos moleculares diversos, contribui para que a identificação e quantificação dos seus constituintes seja, por vezes, bastante difícil. O pré-fraccionamento das amostras, nomeadamente por cromatografia preparativa, antes da análise é uma prática comum. Tendo em atenção o excessivo tempo de análise que estes procedimentos implicam, procurou-se neste trabalho desenvolver e validar uma nova metodologia analítica por SPME/GC-FID, na qual se utilizou a microextracção em fase sólida (SPME) como única etapa de preparação das amostras. Estudaram-se as condições

óptimas de extracção em *headspace* por SPME para os compostos em estudo. Factores com influência no processo extractivo como: o revestimento da fibra, a temperatura de extracção, a força iónica e o tempo de extracção foram avaliados. As fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) e de poliacrilato (PA) foram comparadas, tendo revelado esta última maior afinidade para os compostos estudados. Em consequência dos resultados obtidos foram adoptadas as seguintes condições analíticas: fibra de poliacrilato, tempo de extracção de 60 minutos, amostra a 40°C e teor de sal (NaCl) de 20% (m/v). Para a validação da metodologia analítica foram avaliadas a gama linear, os limites de detecção, a precisão e a exactidão do método, tendo este revelado uma boa linearidade na gama de concentrações estudada e elevada precisão.

Para a obtenção dos extractos/óleo essencial de Esteva foi utilizado o processo de destilação e extracção simultânea (SDE). Este pode ser considerado um processo combinado de extracção e destilação, apresentando algumas vantagens sobre a utilização dos dois métodos em separado. Os parâmetros natureza do solvente e tempo de extracção foram estudados de modo a avaliar a sua influência na eficiência de extracção dos compostos objecto de estudo.

De acordo com os resultados obtidos na optimização do processo extractivo as melhores eficiências de extracção, com valores compreendidos entre 64,7 e 84,6%, foram observadas para o solvente pentano e para um tempo de extracção de 60 minutos. O processo de destilação e extracção simultânea (SDE) revelou ainda uma boa reprodutibilidade, com coeficientes de variação inferiores a 10%, e índices de recuperação próximos dos valores registados para as eficiências de extracção.

Por último, procedeu-se à extracção de amostras de Esteva, nas condições optimizadas, e os extractos obtidos foram analisados por SPME/GC-FID tendo sido identificados e quantificados o α -pineno, a 2,2,6-trimetilciclohexanona, o borneol e o acetato de bornilo nas concentrações médias de 393,4 mg/L, 108,5 mg/L, 52,3 mg/L e 68,6 mg/L respectivamente.

Abstract

The present work arises from the recognition of the Portuguese natural flora potentialities, particularly rich in aromatic species, and from the need of the preservation and development of the forest areas. Believing that the best way to achieve that goal is to promote the value of these natural resources, it was tried to get and characterize extracts (essential oil) from the vegetal species rock-rose (*Cistus ladanifer* L.), aiming the identification and quantification of compounds with the high commercial value compounds. Being a native and abundant plant in national territory, rock-rose produces a resin called labdanum, which has been extracted either by distillation or solvent extraction in countries such as Spain and France. The yield products are particularly appreciated for its balsamic odour, but mainly due to its fixative properties.

The essential oils are some of the most valuable products obtained from plants. They are highly appreciated for their aromatic properties for which the terpenic oxygenated compounds are the main responsables. Thus, the identification and quantification in the rock-rose extracts of the presence of the monoterpene alcohols linalool, borneol, α -terpineol, geraniol, citronellol, of the bornyl and geranyl acetates, and also the phenylpropanoid eugenol, were one of the main objectives of this work. The α -pinene and the 2,2,6-trimethylcyclohexanone have also been included in this group of compounds of interest as they are frequently referred as predominant components of the rock-rose essential oil. Most essential oils are complex mixtures of substances with different chemical classes and molecular weight, which make their identification and quantification sometimes rather difficult. Fractionation of essential oils before analysis, namely by preparative GC, is a common procedure. Instead of this tedious procedure, the current study intended to develop and validate a new methodology by SPME/GC-FID, where the solid-phase microextraction (SPME) was used as the unique step of sample preparation. In order to determine optimum extraction conditions such as the fiber coating, the extraction temperature, the ionic strength and the extraction time, several essays were performed. Polidimethylsiloxane (PDMS) and polyacrilate (PA) fibers were compared being the latter the most efficient to extract the studied compounds. As a result, the following analytical conditions were adopted: PA fiber, 60 minutes extraction time, sample kept at 40°C and 20% (m/v) in salt content. For the validation of the analytical methodology, linearity range,

detection limits, precision and accuracy were evaluated. The method showed a good linearity in the studied concentration range and high precision.

Simultaneous distillation extraction (SDE) technique was used to isolate the extracts/essential oils from rock-rose. Several essays were carried out in order to evaluate the influence of the nature of the solvent and the extraction time in the recovery of the compounds. According to the results in the optimization of the extractive process, the best efficiencies of extraction, with values from 64,7% to 84,6%, were observed when using the pentane solvent and for 60 minutes extraction time. The SDE process also showed good reproducibility, with coefficient variation below 10% and recoveries similar to the registered values for the extraction efficiencies.

Once concluded the extraction of samples of rock-rose, the obtained extracts were analysed by SPME/GC-FID being α -pinene, 2,2,6-trimethylcyclohexanone, borneol and bornyl acetate were detected with average concentrations of 393,4 mg/L, 108,5 mg/L, 52,3 mg/L and 68,6 mg/L respectively.

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	7
2.1 Aplicações dos Óleos Essenciais.....	8
2.2 Métodos de Extracção.....	10
2.2.1 Técnicas Convencionais/Tradicionais de Extracção.....	11
2.2.1.1 Destilação.....	11
2.2.1.2 Expressão.....	12
2.2.1.3 Enfloragem.....	12
2.2.1.4 Extracção por solvente.....	13
2.2.2 Técnicas de Extracção Recentes.....	14
2.2.2.1 Extracção Assistida por Microondas.....	14
2.2.2.2 Extracção com Fluidos Supercríticos.....	15
2.2.2.3 Extracção com Fluidos Subcríticos.....	16
2.2.3 Processo de Destilação – Extracção Simultânea (SDE).....	17
2.3 Composição Química dos Óleos Essenciais.....	24
2.3.1 Factores de Variabilidade da Composição Química dos Óleos Essenciais.....	28
2.4 Análise dos Óleos Essenciais – Técnicas Analíticas.....	29
2.4.1 Microextracção em Fase Sólida – SPME.....	32
2.4.1.1 Alguns fundamentos teóricos.....	33
2.4.1.2 Optimização dos parâmetros SPME.....	35
2.4.1.3 Microextracção em fase sólida de voláteis terpénicos.....	39
3 A ESTEVA – <i>CISTUS LADANIFERUS</i> L.....	47
3.1 Produtos Obtidos a Partir da Esteva.....	48
3.2 Composição Química do Óleo Essencial de Esteva.....	51

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 Materiais.....	55
4.1.1 Material Vegetal.....	55
4.1.2 Padrões e Reagentes.....	55
4.1.3 Equipamento.....	56
4.2 MÉTODOS.....	57
4.2.1 Preparação dos Padrões analíticos.....	57
4.2.2 Extracção do óleo essencial.....	57
4.2.3 Análise do óleo essencial.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Análise Cromatográfica dos padrões por Injecção Directa.....	62
5.2 Desenvolvimento do Método de Extracção por SPME.....	67
5.2.1 Selecção do tipo de fibra.....	68
5.2.2 Efeito da temperatura de extracção.....	70
5.2.3 Efeito da força iónica.....	72
5.2.4 Efeito do tempo de extracção.....	74
5.3 Validação do Método de Análise por SPME/GC-FID.....	76
5.3.1 Estudo da precisão e exactidão da extracção por SPME.....	79
5.3.2 Eficiência de extracção.....	81
5.4 Obtenção de extractos de Esteva por Destilação – Extracção Simultânea.....	83
5.4.1 Optimização das condições de Extracção por SDE.....	83
5.4.2 Reprodutibilidade e Exactidão do Processo de Extracção por SDE.....	88
5.5 Análise dos Extractos de Esteva isolados por SDE.....	90
6 CONCLUSÕES.....	93
7 BIBLIOGRAFIA.....	96
ANEXOS.....	104
ANEXO A.....	104
ANEXO B.....	117
ANEXO C.....	125
ANEXO D.....	151
ANEXO E.....	178

ABREVIATURAS

Ac	Acetato
^{13}C -RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono -13
^1H -RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
BTEX	Hidrocarbonetos aromáticos – benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
CAR-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano
CEVC	Compostos de elevado valor comercial
COV	Compostos orgânicos voláteis
CSWE	Extracção com H_2O subcrítica
CW/DVB	Carbowax-divinilbenzeno
DVB	Divinilbenzeno
FID	Detector por ionização de chama
FSC	Fluidos supercríticos
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
GCxGC	Cromatografia gasosa bidimensional
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HS-SPME	Microextracção em fase sólida em <i>headspace</i>
MAE	Extracção assistida por microondas
MDGC	Cromatografia gasosa multidimensional
MS	Espectrometria de massa
PA	Poliacrilato
PCB	Policlorobifenilos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
PHA	Hidrocarbonetos poliaromáticos
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SC- CO_2	Extracção com CO_2 supercrítico
SDE	Processo de destilação e extracção simultânea
S-HS	<i>Headspace</i> estático
SPME	Microextracção em fase sólida

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela.1 Principais características físico-químicas dos compostos seleccionados.....	5
Tabela 2. Eficiência de extracção (%), por SDE em função do tempo.....	18
Tabela 3. Estudo da influência da pressão e do solvente na eficiência de extracção (%)..... por SDE.	19
Tabela 4. Eficiências de extracção (%) obtidas por SDE para a mistura teste.....	19
Tabela 5. Exemplos de monoterpenos cíclicos e acíclicos presentes em óleos essenciais.....	25
Tabela 6. Exemplos de sesquiterpenos acíclicos e cíclicos presentes em óleos essenciais.....	26
Tabela 7. Exemplos de compostos aromáticos presentes em óleos essenciais.....	27
Tabela 8. Fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	36
Tabela 9. Limites de detecção e gama de linearidade de alguns voláteis, presentes..... no headspace de sumos de laranja, para a fibra de poliacrilato.	41
Tabela 10. Estudo de linearidade de alguns voláteis presentes no headspace de vinhos..... para a fibra de poliacrilato.	43
Tabela 11. Classificação taxonómica da espécie <i>Cistus Ladanifer</i> L.....	47
Tabela 12. Principais constituintes da fracção neutra do óleo essencial de..... <i>Cistus ladanifer</i> .	52
Tabela 13. Resultados obtidos para a composição química de dois óleos essenciais..... de <i>Cistus</i>	52
Tabela 14. Principais constituintes observados no extracto de diclorometano de folhas..... de <i>Cistus ladanifer</i> L.	54
Tabela 15. Resultados do estudo de linearidade da análise cromatográfica dos padrões..... por injeção directa.	64
Tabela 16. Condições de linearidade para análise cromatográfica dos padrões por..... injeção directa.	65
Tabela 17. Resultados para a precisão da análise cromatográfica dos padrões por..... injeção directa.	66
Tabela 18. Resultados do estudo de linearidade da análise cromatográfica dos..... padrões extraídos por SPME.	78

Tabela 19. Condições de linearidade para análise cromatográfica dos padrões extraídos.....	79
por SPME.	
Tabela 20. Resultados para a precisão da análise cromatográfica dos padrões usando.....	80
SPME.	
Tabela 21. Recuperações médias obtidas nas extracções dos padrões por SPME.....	80
Tabela 22. Eficiências médias (em %) obtidas nas extracções dos padrões por SPME.....	81
Tabela 23. Eficiências médias de extracção por SDE obtidas para os vários solventes.....	84
em estudo	
Tabela 24. Valores obtidos para o estudo da reprodutibilidade da extracção por SDE.....	88
Tabela 25. Recuperações médias obtidas por SDE.....	89
Tabela 26. Concentrações médias dos compostos identificados nos extractos de Esteva.....	91
isolados por SDE.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incêndios florestais em Portugal Continental, na última década.....	2
Figura 2. Estudo da eficiência de extracção média em função do tempo de extracção.....	20
Figura 3 Estudo da eficiência de extracção média em função da temperatura de..... arrefecimento no condensador.	21
Figura 4. Dispositivo de análise por SPME.....	32
Figura 5. Principais produtos derivados da esteva.....	49
Figura 6. Esquema do aparelho de SDE.....	59
Figura 7. Cromatograma obtido para uma mistura padrão contendo os compostos..... em estudo com uma concentração individual de ~100 mg/L	63
Figura 8. Curvas de calibração de α -pineno, 2,2,6-trimetilciclohexanona, linalol..... Borneol, α -terpineol, para injeção directa.	63
Figura 9. Curvas de calibração de citronelol, geraniol, acetato de bornilo, eugenol..... acetato de geraniol, para injeção directa.	64
Figura 10. Estudo da influência do tipo de fibra na eficiência de extracção em solução..... aquosa por HS-SPME.	68
Figura 11. Estudo da influência da temperatura na eficiência de extracção em solução..... aquosa por HS-SPME.	70
Figura 12. Estudo do efeito do aumento da força iónica na eficiência de extracção em..... solução aquosa por HS-SPME.	72
Figura 13. Estudo do efeito do tempo de extracção na eficiência do método em..... solução aquosa por HS-SPME.	74
Figura 14. Cromatograma obtido para uma mistura padrão de concentração ~100 μ g/L..... após extracção por SPME.	75
Figura 15. Curva de calibração de α -pineno usando SPME.....	76
Figura 16. Curvas de calibração de extractos por SPME de padrões..... De 2,2,6-trimetilciclohexanona, linalol, borneol, α -terpineol e eugenol.	77
Figura 17. Curvas de calibração de extractos por SPME de padrões de citronelol..... geraniol, acetato de bornilo e acetato de geraniol.	77
Figura 18. Eficiências médias de extracção obtidas por SDE.....	84
Figura 19. Estudo da eficiência de extracção média em função do tempo.....	86
Figura 20. Cromatograma obtido para um extracto por GC-FID após SPME.....	90

1 Introdução

Nos anos mais recentes, a extinção de espécies vegetais e o desaparecimento de áreas naturais, resultado da actividade humana, tem ocorrido a um ritmo considerado preocupante. Este é um fenómeno global, a biodiversidade do planeta parece encontrar nos nossos dias uma das mais fortes ameaças. A perda de diversidade biológica tem sérias implicações. A extinção de espécies representa uma perda de informação genética única, muitas vezes essencial para o desenvolvimento de medicamentos e para a produção de alimentos.

O reconhecimento da necessidade de conservação da biodiversidade tem impulsionado à escala internacional um conjunto de iniciativas de natureza social mas também políticas, como a Convenção sobre a Diversidade Biológica, que Portugal ratificou em 1993. A conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável dos recursos naturais e a partilha justa e equitativa dos benefícios resultantes da utilização desses mesmos recursos, são os objectivos fundamentais adoptados pela Convenção sobre a Diversidade Biológica.

Para o cumprimento destes objectivos a Comunidade Europeia, onde Portugal se insere, desenvolveu uma rede ecológica denominada Rede Natura 2000, resultante da implementação de duas Directivas comunitárias distintas: a Directiva "Aves" (Dir. 79/409/CEE) e a Directiva "Habitats" (Dir. 92/43/CEE). A Rede Natura 2000 é considerada um instrumento fundamental da política da União Europeia em matéria de conservação da natureza e da diversidade biológica. Aproximadamente 21,3% do território nacional integram esta rede, o que é significativo e revelador da riqueza do património natural português.

Portugal possui aliás uma das maiores proporções de área de floresta na Europa. As florestas portuguesas representam 38% do território nacional, o equivalente a 3 349 000 de hectares. A Floresta é o quarto sector mais importante da actividade económica Portuguesa, sendo responsável por 3,3% do emprego total e geradora de receitas de exportação de 2748 milhões de euros (Programa de Acção Para o Sector Florestal, 2003). Os recursos explorados com maior expressão são a produção de madeira, de resina, cortiça e celulose, o que tem reflexos no povoamento florestal. Este é dominado pelo

pinheiro bravo (30%), sobreiro (22%) e eucalipto (21%) (Inventário Florestal Nacional, 3ª Revisão, 2001).

A situação do sector florestal tem-se caracterizado, na opinião dos responsáveis, por um desenvolvimento insuficiente com subaproveitamento do potencial existente, pela sobre-exploração de alguns recursos, pela grande vulnerabilidade a factores de erosão e até mesmo pela destruição do seu potencial produtivo por força dos incêndios florestais (Programa de Acção Para o Sector Florestal, 2003).

Estes são factores que tem contribuído para um desenvolvimento não sustentável dos recursos florestais, o que coloca em risco a conservação da própria Floresta e a biodiversidade que ela encerra. A gestão florestal sustentável é um objectivo estratégico, claramente reconhecido e expresso no Programa de Acção Para o Sector Florestal apresentando em Fevereiro de 2003. O programa que o documento preconiza encontra-se dividido em onze acções que vão desde a articulação institucional até ao reconhecimento da necessidade de programas de investigação e desenvolvimento florestal (I&D), passando pela necessidade urgente de adopção de medidas de prevenção de incêndios. Estes representam uma das principais ameaças ao desenvolvimento sustentável, transformando todos os Verões a paisagem florestal, de modo quase inevitável.

A figura 1 ilustra a evolução da área ardida ocorridos na última década em Portugal Continental (Incêndios Florestais – 2001, Relatório Provisório, Direcção Geral das Florestas).

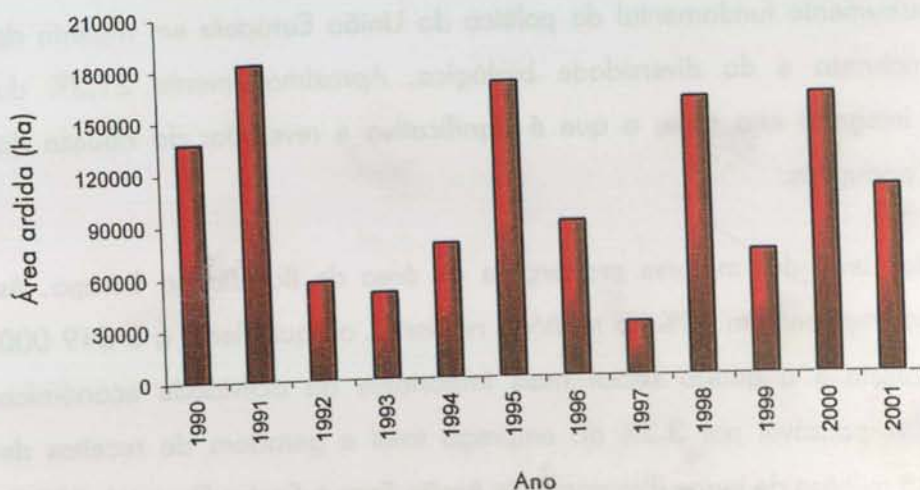


Figura 1. Incêndios florestais em Portugal Continental, na última década.
(Fonte: Direcção Geral das Florestas)

As razões para a ocorrência dos incêndios são complexas. De um lado estão as condições naturais, isto é as características próprias do ecossistema Mediterrâneo. O clima que se caracteriza pela existência de uma estação quente e seca (propício à ocorrência de incêndios florestais) e de uma estação fria e húmida é favorável ao desenvolvimento de uma vegetação predominantemente arbustiva, formando matos contínuos. Durante o tempo quente e seco de Verão, estes matos formam uma camada combustível capaz de propagar os incêndios. Esta situação que é natural, uma vez que o fogo sempre fez parte dos ecossistemas Mediterrânicos como factor de alteração e renovação da paisagem, assume agora dimensões preocupantes.

O êxodo rural e o decréscimo da actividade agrícola são factores que contribuíram para o aumento da frequência de fogos florestais em Portugal. O abandono agrícola levou ao abandono dos matos e florestas contribuindo deste modo para o incremento dos fogos florestais. A industrialização da própria agricultura levou à desvalorização económica dos resíduos florestais. Os matos que tiveram outrora uma utilidade própria, sendo explorados pelo homem para obtenção de lenha, carvão, de camas para o gado e para ajudar a preparar estrumes, estão hoje devotados ao abandono. Outro conjunto de factores não menos importantes resultam da acção directa do homem que, quer por acção negligente ou até mesmo de natureza criminal ou por omissão, é o principal responsável pelo grave problema dos incêndios.

A estratégia para a prevenção dos incêndios tem residido num conjunto de acções de reestruturação das explorações florestais. A ausência de uma eficaz gestão florestal é apontada no Programa de Acção Para o Sector Florestal como potenciadora do risco de incêndio. A construção de caminhos, aceiros e sua reparação, construção de pontos de água e de helipistas, a vigilância e a sensibilização da população são medidas importantes que tem vindo a ser implementadas. Olhando no entanto para as estatísticas (ver figura 1) e apesar do esforço já desenvolvido os resultados continuam aquém do desejável. Um outro conjunto de medidas que poderá ser decisivo para a inversão dos números reside na valorização económica dos próprios resíduos florestais, o que incentivaria a limpeza das matas. Uma das alternativas é o seu aproveitamento energético. Em Portugal temos como exemplo a central termoeléctrica de Mortágua. Uma outra abordagem para a valorização dos resíduos florestais é a que se propõe neste trabalho. A biodiversidade da floresta Portuguesa encerra uma série de espécies espontâneas que

apresentam características aromáticas, medicinais e condimentares. Portugal é possuidor de uma flora aromática de grande potencial, particularmente rica em óleos essenciais, e que se encontra desaproveitada. Nos matos encontram-se espécies vegetais como o rosmaninho, a alfavaca, as estevas, os tomilhos, o manjeriço, o alecrim e a hortelã entre outras. A exploração destes recursos poderá ser também a melhor forma de os conservar.

De entre os compostos mais valiosos produzidos pelas plantas, encontram-se os óleos essenciais, princípios odoríferos utilizados, desde a antiguidade, tanto com fins terapêuticos, como no fabrico de perfumes e cosméticos. O interesse renovado pela utilização de substâncias naturais, biologicamente activas, tem encorajado a sua utilização. Para tal, tem também contribuído o facto de os óleos essenciais aliarem ao seu papel aromatizante, a condição de serem produtos naturais e biodegradáveis, apresentarem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Estas propriedades têm despertado nos últimos anos um interesse crescente, a nível mundial, pelo estudo das plantas produtoras de óleos essenciais. Muitos dos estudos visam obter matéria-prima para as indústrias alimentar e de perfumaria. Com efeito, estas indústrias utilizam os óleos essenciais no seu todo, para reproduzirem sabores e/ou odores naturais, ou apenas alguns dos seus componentes, nomeadamente os monoterpenos, como matéria-prima de base para a síntese total ou parcial de novos compostos de elevado valor comercial (CEVC).

Pretendeu-se assim, neste trabalho, avaliar e caracterizar alguns extractos/óleos essenciais de espécies vegetais, e estudar a viabilidade no que diz respeito à extracção de compostos orgânicos de valor comercial com aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentar, mas principalmente na indústria da perfumaria e cosméticos.

Da variedade de compostos que constituem os óleos essenciais, que são, na sua grande maioria misturas muito complexas, exigindo o estudo da sua composição química um grande esforço e o recurso a técnicas analíticas sofisticadas, assumem particular importância os compostos oxigenados. Estes são os principais responsáveis pelas características organolépticas dos óleos, sendo prática comum da indústria a remoção dos hidrocarbonetos para acentuação da nota odorífica dos compostos oxigenados. Deste modo, foram inicialmente seleccionados para este estudo alguns dos mais importantes álcoois monoterpénicos usados em fragrâncias como notas de topo ou intermédias, sendo eles o linalol, α -terpineol, borneol, citronelol e geraniol. Para além destes compostos, que poderemos considerar os mais valorizados, foram ainda seleccionados o fenilpropanóide

eugenol, os acetatos de bornilo e de geranilo, substâncias que encontram também uma importante aplicação em fragrâncias e por último o α -pineno e a 2,2,6-trimetilciclohexanona. Estes dois últimos compostos foram incluídos no estudo pelo facto de na literatura consultada serem indicados como principais constituintes da espécie objecto de estudo neste trabalho, a Esteva (*Cistus ladanifer* L.). Apresentam-se na tabela 1 algumas das principais características físico-químicas dos compostos seleccionados.

Tabela.1 Principais características físico-químicas dos compostos seleccionados.

Composto	Fórmula Molecular	Peso Molecular	p.e. (°C)	p.v. (mm Hg) ^a	Sol. H ₂ O (mg/L) ^a	Constante Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹) ^a
α -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136,2	155,9	4,75	2,49	0,294
*Hexanona	C ₉ H ₁₆ O	140,2	178,5	-	-	-
Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2	197	0,16	1589	2,15x10 ⁻⁵
Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2	-	0,0353	738	6,7x10 ⁻⁶
α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2	220	0,0423	710	1,22x10 ⁻⁵
Citronelol	C ₁₀ H ₂₀ O	156,3	224,5	0,04406	211,8	5,68x10 ⁻⁵
Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2	230,2	0,03001	100	5,89x10 ⁻⁵
Acetato de bornilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196,3	227	0,228	23,23	4,37x10 ⁻⁴
Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164,2	253,2	0,0226	2463	4,81x10 ⁻⁸
Acetato de geranilo	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	196,2	240-242	0,033	6,885	2,42x10 ⁻³

* 2,2,6-trimetilciclohexanona

a – à temperatura de 25°C

p.e. – ponto de ebulição; p.v. – pressão de vapor; Sol. H₂O – solubilidade em água

Fonte: SRC PhysProp Database 2001

Era intenção inicial do estudo proceder à avaliação de um maior número de espécies vegetais da nossa flora, mas este objectivo foi fortemente condicionado quer pela mudança de instalações da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, onde decorreu a execução experimental, quer ainda pelas condições encontradas nas novas instalações. Deste modo o que se desenvolveu foi uma metodologia de extracção e análise dos extractos que se aplicou à Esteva mas que poderá ser, em estudos posteriores, aplicada e adaptada a extractos de outras espécies, bem como a misturas de várias espécies, como por exemplo a amostras reais de mato.

Tradicionalmente os óleos essenciais são, preferencialmente, isolados por destilação. Sendo reconhecido que o método de extracção é um dos factores que influencia a composição dos extractos optou-se, neste estudo, pelo recurso a novas técnicas de extracção. Pelas suas características o processo de destilação e extracção simultânea (SDE) poderá assumir-se como uma boa alternativa. Este não é um processo conhecido pela

indústria sendo no entanto bastante utilizado a nível laboratorial para a extracção de voláteis a partir de diversas matrizes, com bons resultados. Um outro processo particularmente promissor e que tem vindo a ser utilizado na extracção de produtos naturais é a técnica de extracção com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂).

O processo de destilação e extracção simultânea e a extracção supercrítica com CO₂ foram as técnicas inicialmente escolhidas para obtenção dos extractos. No entanto em consequência da já referida mudança de instalações da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, não foi possível avaliar a extracção por SC-CO₂.

Para o estudo da composição dos extractos de Esteva, obtidos por SDE, foi escolhida a técnica de microextração em fase sólida (SPME) seguida da análise por GC-FID. A complexidade apresentada pela grande maioria dos óleos essenciais implica normalmente a necessidade de proceder ao seu fraccionamento. A opção pela técnica de SPME surge, assim, com o propósito de simplificar a matriz dos extractos, permitindo de um modo expedito a sua introdução para análise por cromatografia gasosa.

2 Óleos Essenciais

De acordo com a Norma Portuguesa NP-90 de 1970, designam-se por óleos essenciais ou essências os “produtos odoríferos naturais, brutos ou rectificados, voláteis à temperatura ambiente e extraídos de plantas por processos físicos tais como: expressão, destilação, dissolução, extracção por solventes, enfloragem e maceração”.

Os óleos essenciais ocorrem apenas nas plantas superiores. Das 350 000 espécies de plantas conhecidas cerca de 60 000 são consideradas plantas medicinais, capazes de sintetizar substâncias designadas por princípios activos, que exercem acção farmacológica. Destas, cerca de 17 500 são plantas ditas aromáticas (Boelens, 1997; Bruneton, 1999). O género capaz de sintetizar os constituintes dos óleos essenciais está distribuído por um número limitado de famílias, por exemplo: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae* e *Piperaceae* (Bruneton, 1999).

A síntese e acumulação do óleo essencial estão geralmente associadas à presença de estruturas histológicas especializadas, frequentemente localizadas na superfície da planta, ou perto desta. De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam os óleos essenciais em órgãos anatómicos específicos, tais como: flores, folhas, raízes, rizomas, sementes, tecido lenhoso, e frutos. Todos os órgãos de uma dada espécie podem conter óleo essencial, mas a composição deste varia, normalmente, com a localização na planta. De um modo geral a quantidade de óleo essencial é pequena, sendo frequentemente inferior a 10 mL/Kg de planta seca (Bruneton, 1999). Quimicamente, na sua maioria, os óleos essenciais são constituídos por substâncias terpénicas e em alguns casos por fenilpropanóides.

Na fisiologia vegetal, os óleos essenciais, são considerados metabolitos secundários, não imprescindíveis para o desenvolvimento da planta, para as suas funções vitais. Na maior parte dos casos a função biológica do óleo essencial não é muito clara. Acredita-se no entanto que eles representam um papel ecológico, hipótese que é suportada por algumas experiências que provaram a função de alguns terpenóides nas interacções da planta com o ecossistema que a rodeia. Protecção contra predadores (insectos, fungos), atracção de espécies polinizadoras, agentes alelopáticos inibidores da germinação e crescimento de

espécies competidoras, são algumas das funções que lhes são atribuídas (Dudareva e Pichersky, 2000; Pichersky e Gershenzon, 2002).

À temperatura ambiente os óleos essenciais são líquidos, mas são também voláteis, o que os diferencia dos óleos gordos, de composição glicérica. Raramente são coloridos, de um modo geral a sua densidade é inferior à da água, possuem elevados índices de refração e muitos deles rodam o plano da luz polarizada. São solúveis em solventes orgânicos, lipossolúveis e muito pouco solúveis em água (Bruneton, 1999).

2.1 Aplicações dos Óleos Essenciais

Os primeiros registos de óleos essenciais remetem-nos para Oriente e para as civilizações clássicas da Antiguidade (Egipto, Pérsia, Índia). Registos pictóricos confirmam a existência, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas a curas, a unções da realeza, e à procura de bem-estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores e sementes.

Quer os povos gregos quer os romanos estabeleceram rotas comerciais com o Oriente para obtenção destes produtos. A sua raridade e elevado custo, contribuíram para que durante muito tempo fossem considerados objectos de luxo e factor de distinção social. Eram utilizados em cerimónias religiosas sendo até usados como oferendas entre governantes. Muitos destes produtos odoríferos eram utilizados em bruto, enquanto outros eram provavelmente extraídos a partir do material vegetal utilizando gorduras, resultando em pomadas e unções perfumadas.

Os princípios básicos da obtenção de óleos essenciais foram introduzidos pelas civilizações orientais, Índia, Pérsia e Egipto. O desenvolvimento da técnica de destilação, pela civilização árabe, e a sua utilização na extracção das essências foi determinante na difusão destes materiais. Foram os árabes que primeiro destilaram o álcool etílico a partir do açúcar, providenciando assim um novo solvente capaz de extrair os óleos essenciais (Teisseire, 1994).

Foi apenas a partir da Idade Média, em consequência das Cruzadas, que a técnica da destilação foi introduzida na Europa. A destilação de óleos essenciais foi descrita durante

os séculos IX e XIII. A primeira descrição do processo de obtenção de um óleo essencial é atribuída a um médico catalão Arnold de Villanova (1235-1311).

Durante algum tempo a arte da destilação foi usada com o objectivo de produzir "águas destiladas", especialidade das farmácias medievais europeias. O óleo que aparecia à superfície destas águas era visto como um indesejável produto secundário. É durante o início do período renascentista que alguns manuscritos venezianos fazem referência aos óleos destilados de rosmaninho e de salva e não a "águas destiladas". No fim deste período o médico suíço Paracelsus expõem a sua teoria "Quinta essentia", sendo o objectivo da ciência farmacêutica a extracção deste "quinto elemento", o verdadeiro elemento de qualquer preparação farmacêutica. As teorias alquimistas do médico suíço Paracelsus impulsionaram a obtenção de óleos essenciais, e o processo de destilação passou a ser conhecido como o meio de separar o "essencial" do "não essencial". A expressão óleo essencial é ainda evocativa do conceito de quinta-essência de Paracelsus. (Teisseire, 1994).

No século XVIII eram conhecidos na Europa cerca de uma centena de óleos essenciais. É durante este século que se estabelece em Grasse, no sul de França, a indústria de perfumaria baseada no cultivo de plantas aromáticas e extracção de óleos essenciais, sendo ainda hoje um dos maiores centros mundiais produtor e consumidor destes produtos.

Mas não é só na indústria da perfumaria que os óleos essenciais encontram aplicação. As suas propriedades odoríficas são também apreciadas pelo sector industrial alimentar, de cosmética e farmacêutico. Para além da função aromatizante, são ainda atribuídas aos óleos essenciais propriedades terapêuticas (Buchbauer *et al.* 1993), encontrando grande aplicação na medicina popular e alternativa. Na medicina dita moderna ou convencional a sua aplicação é bastante mais restrita. O estudo da actividade farmacológica dos óleos é particularmente difícil uma vez que estes são na sua grande maioria misturas frequentemente constituídas por centenas de compostos. De entre as principais acções farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais destacam-se a actividade anti-séptica e desinfectante, anti-inflamatória, espasmolítica, sedativa e actividade microbiana (Buchbauer *et al.*, 1993; Cowan, 1999). Particularmente importante é também a capacidade antioxidante revelada por alguns óleos essenciais (Dorman *et al.*, 2000)

De referir ainda a utilização de alguns óleos essenciais pela indústria química para obtenção de substâncias utilizadas na síntese de compostos com valor acrescentado em perfumaria. A obtenção do α -pineno a partir do óleo de terebintina ou do geraniol a partir do óleo de palmarosa, são disso exemplo (Teisseire, 1994; Bruneton, 1999).

2.2 Métodos de Extração

A extração dos óleos essenciais pode dar-se logo após a colheita da matéria-prima, quando há o risco de ocorrência de perdas e alterações (o que acontece com as flores), ou então procede-se à sua armazenagem e secagem (raízes, cascas, folhas, frutos, sementes). Quer a armazenagem como a secagem modificam e podem prejudicar as qualidades dos óleos essenciais pela ocorrência de volatilizações, hidrólises, oxidações, e polimerizações.

O rendimento e a composição química dos óleos essenciais variam de acordo com a origem geográfica e qualidade do material da planta, a altura do ano em que é colhida e o método de extração utilizado. De um modo geral os processos extractivos são susceptíveis de modificar a composição dos óleos essenciais, quer pela produção de artefactos durante a extração quer pelas alterações sofridas por alguns compostos mais sensíveis às condições de operação. A opção por um determinado método de extração depende da natureza e quantidade de material disponível mas também da qualidade desejada para o extracto. Um aspecto importante para a indústria dos óleos essenciais é a sua qualidade final. Daí que a grande aposta e desafio da indústria do ramo reside no desenvolvimento de técnicas de extração cada vez mais representativas do aroma/odor original da planta.

2.2.1 Técnicas Convencionais/Tradicionais de Extração

2.2.1.1 Destilação

Do conjunto de processos hoje disponíveis, a destilação é sem sombra de dúvida o mais usado para a extração dos óleos essenciais (Teisseire, 1994; Boelens, 1997; Luque de Castro *et al.*, 1999). A indústria prefere o método da destilação pelo vapor de água em consequência da sua maior simplicidade e economia.

Os destilados recolhem-se em aparelhos de separação e as duas fases (água/essência) separam-se, regra geral, imediatamente após a condensação, por diferença de densidade e imiscibilidade. O processo de destilação é aplicável a flores, folhas, raízes e até plantas inteiras, permitindo obter em simultâneo os óleos essenciais e as águas aromáticas ou florais, águas de condensação saturadas de óleo essencial. A experiência determinou, para cada planta o tempo de extracção para a obtenção do melhor produto (maior qualidade) ao menor custo. Pela forma como se estabelece o contacto entre a planta e a água, podem ser distinguidos três processos de destilação das essências, a hidrodestilação, a destilação pela água e pelo vapor e a destilação por arrastamento de vapor (Boelens, 1997).

No primeiro processo, hidrodestilação, o material a destilar é completamente imerso em água. É uma técnica utilizada quando a substância se encontra pulverizada finamente, em virtude de não poder ser destilada de outro modo (canela) ou quando se formam massas gelatinosas com o vapor (pétalas de rosas). O óleo essencial é extraído e volatilizado pela acção da água em ebulição, sendo depois recolhido por condensação. O produto é uma mistura de água mais óleo essencial, sendo os dois líquidos separados por decantação ou centrifugação. Este processo apresenta como desvantagens a sua morosidade e o risco de ocorrência de alterações (hidrólise dos ésteres e polimerização dos aldeídos) devido ao aquecimento prolongado em contacto com a água, perdas dos compostos mais solúveis e degradação de outros (Teisseire, 1994; Luque de Castro *et al.*, 1999).

No processo de destilação pela água e pelo vapor, a matéria-prima e a água encontram-se separadas por uma rede (Boelens, 1997). Este método tem como principal vantagem o reduzido contacto com a água e portanto menor risco de hidrólise dos ésteres e polimerização dos aldeídos, quando comparado com o método de hidrodestilação. O material vegetal é colocado numa grelha acima do nível de água e a corrente de vapor gerada atravessa o material, extraindo os constituintes voláteis.

Na destilação por arrastamento com vapor a fase aquosa está ausente e o vapor é introduzido. Este é o método mais indicado para a grande maioria dos óleos. A destilação é geralmente executada a pressões reduzidas de modo a diminuir a temperatura, permitindo adaptar o processo a diversas substâncias (Bruneton, 1999).

2.2.1.2 Expressão

A par da destilação por vapor, a extracção por expressão, é também um processo com grande difusão industrial. Esta é uma técnica apenas utilizada quando os órgãos segregadores dos óleos essenciais se encontram à superfície sendo possível extrair o óleo essencial, sob acções mecânicas. Este método é principalmente usado na extracção dos óleos de frutos do género *Citrus* (limão, lima, laranja, toranja, tangerina) (Boelens, 1997; Bruneton, 1999). Originalmente, a casca era esmagada/pressionada, e o óleo libertado recolhido numa esponja. Hoje o processo é mecânico e na maioria dos casos o sumo e o óleo são recolhidos em simultâneo e separados por decantação. Este processo tem a vantagem de não expor, como a destilação, os óleos a elevadas temperaturas, diminuindo o risco de degradação pela acção do calor. No entanto o óleo está em contacto com a solução ácida do sumo. Uma vez que o óleo contém componentes ligeiramente solúveis em água, estes podem se perder. Em simultâneo poderá ocorrer a hidrólise de alguns ésteres e reacções catalizadas pelo meio ácido. Para minimizar estes efeitos a pele é por vezes separada do resto do fruto e processada separadamente.

2.2.1.3 Enfloragem

Um outro processo extractivo resultante do conhecimento da lipossolubilidade dos compostos odoríficos em gorduras é a técnica de enfloragem, "enfleurage", introduzida no século XVIII, pela indústria francesa de Grasse (Teisseire, 1994). Este é um processo de extracção a baixa temperatura por contacto directo, em alternativa à imersão total, em gorduras, sendo considerada uma das técnicas que melhor reproduz o odor original do material vegetal. Processo desenvolvido para captar o aroma de flores (jasmim, violeta, rosa, gardénia e a flor de laranjeira) que contêm muito pouco óleo essencial, ou cujas delicadas fragrâncias são alteradas pela acção do calor, e que vão libertando as essências mesmo depois de colhidas. As flores (ou pétalas) são distribuídas sob uma camada de gordura, altamente purificada e aí deixadas por um período de 24 a 72 horas. O perfume exalado pelas flores é absorvido pela gordura, e estas vão sendo periodicamente substituídas por flores frescas até a gordura ficar saturada, obtendo-se um produto designado de pomada. A extracção em álcool a frio, da pomada, permite obter um extracto que pode ser usado tal qual ou concentrado por remoção do álcool, resultando

no absoluto de enfloragem. Este é no entanto um processo moroso e tão exigente do ponto de vista de trabalho manual que tem vindo a ser progressivamente abandonado e substituído pela extracção com solventes orgânicos (Teisseire, 1994).

2.2.1.4 Extracção por solvente

O termo extracção por solvente abrange uma classe de técnicas que vão desde o simples mergulhar do material da planta em solventes orgânicos, à temperatura ambiente ou abaixo desta, até à extracção com solvente a quente, num aparelho tipo Soxhlet. No processo ocorre a extracção não só do óleo mas também de material não volátil, principalmente ceras (Milner *et al.*, 1997). Após a remoção do solvente obtém-se uma pasta sólida designada por concreto, que é depois dissolvida em álcool a frio, de modo a separar as substâncias odoríficas, que são solúveis, das ceras que são insolúveis no álcool. Este é removido por destilação a pressão reduzida obtendo-se o absoluto. Algumas plantas podem ser extraídas directamente com álcool, o extracto obtido é usualmente pegajoso, viscoso e resinoso sendo designado por resinóide (Teisseire, 1994).

A utilização de temperaturas mais baixas representa uma vantagem comparativamente ao método de destilação a vapor. O ponto de ebulição dos solventes usados é normalmente inferior a 60°C e quando o material é simplesmente mergulhado no solvente a temperatura varia entre os 5 a 25°C. Uma vez que o óleo essencial extraído por solventes orgânicos é mantido a baixas temperaturas durante o processo extractivo, eles são considerados mais “naturais” do que os obtidos por destilação, pois estes últimos estão sujeitos a condições que podem favorecer alterações induzidas pela temperatura e pelas condições de pH do meio (Milner *et al.*, 1997).

A extracção por solvente apresenta no entanto a desvantagem de co-extracção de material não volátil como ceras, clorofilas, entre outros. A escolha do solvente é fundamental para o sucesso do processo, sendo influenciada por parâmetros técnicos e económicos. A selectividade, estabilidade, ponto de ebulição, a toxicidade e a inflamabilidade são alguns dos parâmetros a avaliar correctamente (Bruneton, 1999). Os solventes mais usados são os alifáticos, éter de petróleo, hexano, halogenados, bem como o etanol, sendo este no entanto, aplicado na obtenção de absolutos e resinóides e não directamente na extracção (Boelens, 1997).

As principais desvantagens dos solventes são, a já referida falta de selectividade, resultando na co-extracção de muitas substâncias lipofílicas, e a toxicidade de alguns solventes o que levou a regulamentos restritivos quanto ao seu uso e ao problema dos resíduos no produto final (Bruneton, 1999; Luque de Castro *et al.*, 1999).

Este último aspecto, a par da necessidade de obter produtos com as melhores características são factores que têm impulsionado o desenvolvimento de novas técnicas extractivas.

2.2.2 Técnicas de Extracção Recentes

A extracção assistida por microondas, extracção supercrítica com CO₂ e a extracção contínua com água subcrítica são as alternativas mais recentes em estudo.

2.2.2.1 Extracção Assistida por Microondas

A extracção assistida por microondas (MAE – Microwave Assisted Extraction) é uma técnica simples que permite a extracção de produtos a partir de uma alargada gama de matrizes, pela acção da energia de microondas. A extracção pode dar-se em fase gasosa mas é em fase líquida que é aplicada para extracção de óleos essenciais (Luque de Castro *et al.*, 1999). A energia de microondas é utilizada como fonte de aquecimento de solventes em contacto com a amostra a extrair. A possibilidade de rapidamente se proceder ao aquecimento da mistura amostra/solvente é a sua principal vantagem. Os tempos de extracção são de modo geral reduzidos entre 15 a 30 minutos, assim como o volume de solvente (entre 10 a 30 mL) (Eskilsson e Björklund, 2000). As microondas aquecem directamente a mistura amostra/solvente daí a maior rapidez conferida ao processo. Os parâmetros mais estudados são a natureza e o volume de solvente, tempo e temperatura de extracção e as características da matriz, em particular o seu teor de água (Eskilsson e Björklund, 2000; Huie, 2002). Na extracção de óleos essenciais as moléculas de água, presentes no sistema vascular das plantas, ao serem aquecidas por microondas sofrem expansão, rompendo-se os tecidos e libertando-se as essências. A possibilidade de co-extracção de material não volátil é uma das principais limitações desta técnica (Huie, 2002).

2.2.2.2 Extração com Fluidos Supercríticos

A extração de produtos naturais, em particular a de óleos essenciais, é uma das principais áreas de aplicação da tecnologia dos fluidos supercríticos. O interesse da sua aplicação ao campo da extração/separação está associado às características invulgares, resultantes das suas propriedades físicas estarem compreendidas entre as do estado líquido e gasoso. Estas propriedades conferem aos FSC capacidade de "dissolução" semelhante aos líquidos, com as características de transporte de massa dos gases. A possibilidade de manipulação da capacidade solvente de um FSC (fazendo variar a sua temperatura e ou pressão) é uma característica única que torna possível extrair selectivamente e fraccionar os componentes de uma mistura.

O dióxido de carbono tem sido o solvente supercrítico mais usado. A sua escolha é facilmente justificável se atendermos ao facto de que é uma substância não tóxica, não inflamável nem corrosiva e inerte. A sua baixa temperatura crítica (31,2°C) torna-o ainda num óptimo solvente para extração de produtos passíveis de se degradarem a temperaturas elevadas.

A extração com CO₂ supercrítico (SC-CO₂) tem sido estudada para a obtenção, entre outros, dos óleos essenciais de camomila (Reverchon e Senatore, 1994), alfavaca (Reverchon e Della Porta, 1995), eucalipto (Milner *et al.*, 1997), alecrim (Reverchon *et al.*, 1992; Ibáñez *et al.*, 1999). Uma das vantagens deste processo é a possibilidade de acoplamento a equipamentos cromatográficos. A eficiência da associação SC-CO₂/GC foi estudada na análise das essências de alecrim, tomilho, salsa e coentros (Hawthorne *et al.*, 1988). A extração supercrítica tem também sido utilizada para melhorar a qualidade final dos extractos; através do fraccionamento e remoção dos hidrocarbonetos terpénicos, obtidos pelos métodos convencionais de extração (Reverchon, 1997; Luque de Castro *et al.*, 1999)

Quando avaliada comparativamente com os métodos tradicionais de extração, SC-CO₂ oferece vantagens significativas. A possibilidade de poder variar a selectividade da extração mediante pequenas variações de pressão/temperatura, a obtenção de extractos sem vestígios de solventes, as baixas temperaturas de operação e subsequente diminuição do risco de degradação de substâncias mais sensíveis ao calor, e a maior rapidez da

extracção são sem dúvida as vantagens mais importantes que lhe estão associadas (Reverchon, 1997; Luque de Castro *et al.*, 1999). No entanto o processo de SC-CO₂ apresenta algumas limitações importantes, tais como a co-extracção de substâncias indesejáveis como ceras cuticulares, ácidos gordos, clorofilas e resinas. Com a excepção das ceras cuticulares, a extracção de todos os outros compostos pode ser limitada pela escolha e manipulação das condições de operação. É no entanto impossível num só estágio operativo eliminar as ceras cuticulares, de modo que após a extracção dos óleos essenciais é necessário proceder ao fraccionamento do extracto (Reverchon, 1997; Luque de Castro *et al.*, 1999). Outro aspecto limitativo desta técnica reside no número de parâmetros a otimizar. A optimização das condições de operação é um processo realizado por tentativas uma vez que é difícil prever as solubilidades dos diferentes compostos presentes na amostra e o modo como interagem. Sendo normalmente este último ponto o mais importante e o que condiciona a extracção (Reverchon, 1997; Huie, 2002). Os estudos efectuados nesta área permitem no entanto diminuir a gama de condições de operação, minimizando o número de tentativas para a optimização, mas são ainda insuficientes (Reverchon, 1997). A avaliação da influência dos parâmetros de extracção, a obtenção de solubilidades e a modelação matemática do processo são áreas a merecer atenção nos anos futuros. Por último, mas não menos importante, o elevado preço de aquisição e manutenção do equipamento têm também condicionado a difusão desta técnica.

2.2.2.3 Extracção com Fluidos Subcríticos

As limitações/desvantagens associadas à extracção supercrítica têm de certo modo impulsionado a utilização de fluidos em condições subcríticas, em particular o desenvolvimento do processo extractivo com água subcrítica. A extracção contínua com água subcrítica, (CSWE – continuous subcritical water extraction) é operada a temperaturas compreendidas entre 100°C e 374°C, (ponto crítico da água 221 bar e 374°C) e a pressão suficiente para manter o estado líquido. A possibilidade de facilmente manipular a constante dieléctrica numa gama alargada é sua maior vantagem (Luque de Castro *et al.*, 1999). À temperatura ambiente a água têm uma constante dieléctrica de 80 sendo nestas condições considerada um solvente polar. Este valor pode ser reduzido aumentando a temperatura. Por exemplo, água subcrítica a 250°C e pressão de 40 bar apresenta uma

constante dielétrica de 27, similar ao etanol permitindo a extracção de compostos menos polares. O uso desta técnica na extracção de óleos essenciais é recente e revela-se promissor (Luque de Castro *et al.*, 1999). O processo de CSWE apresenta como vantagens o menor tempo de extracção e maior qualidade do extracto obtido (maior percentagem de compostos oxigenados) (Luque de Castro *et al.*, 1999; Marriott *et al.*, 2001). Apresenta ainda maior eficiência e menor custo energético quando comparada com a hidrodestilação. A limitação mais importante desta técnica é a utilização de temperaturas relativamente elevadas o que pode potenciar a degradação de compostos mais sensíveis às condições térmicas (Luque de Castro *et al.*, 1999). Quando comparada com a extracção supercrítica por CO₂, a técnica de CSWE apresenta importantes vantagens como sejam a não co-extracção de material não volátil e um menor custo do equipamento (Luque de Castro *et al.*, 1999).

2.2.3 Processo de Destilação – Extracção Simultânea (SDE)

A ideia de associar o processo de destilação a vapor com extracção por solvente tem uma origem obscura. É no entanto vulgarmente aceite que o processo de destilação e extracção simultânea (SDE - steam distillation extraction) foi introduzido em 1964, por Likens e Nickerson, para a extracção do óleo essencial de lúpulo.

Desde a sua introdução que o processo de SDE é um dos mais citados na preparação de amostras. Extracção de pesticidas a partir de solos (Seidel e Linder, 1993), de fenóis em águas e solos (Barták *et al.*, 2000) e de constituintes voláteis em diferentes produtos alimentares (Careri *et al.*, 1999; Ansorena *et al.*, 2001) são algumas das aplicações da técnica de SDE.

Esta técnica permite realizar a separação e enriquecimento de substâncias voláteis numa única operação, permitindo uma redução no tempo de operação e diminuição do volume de solvente. O processo consiste em aquecer o solvente (vaporizando-o) procedendo-se em simultâneo à extracção por vapor (gerado por fonte externa ou directamente) dos componentes voláteis da amostra. Os vapores das duas fases (orgânica e aquosa) contendo os voláteis entram em contacto na parte superior do aparelho de SDE. Ambas as fases são condensadas em simultâneo por contacto com um condensador, sendo

separadas por decantação na zona central do aparelho e retornando aos respectivos balões.

A duração da extracção, a temperatura de aquecimento do solvente e da fase aquosa contendo a amostra, bem como a natureza do solvente a usar, são parâmetros que influenciam a eficiência do processo, devendo por isso ser otimizados (Chaintreau, 2001). O melhor compromisso entre os parâmetros acima referidos tem sido determinado empiricamente.

Um dos primeiros estudos sobre a eficiência de extracção de SDE foi realizado por Schultz *et al.*, em 1977, usando uma mistura teste de essências comuns em frutos. Na tabela 2 apresentam-se os valores obtidos para a eficiência de extracção em função do tempo de processamento, trabalhando à pressão atmosférica, para uma mistura teste de concentração 210 mg/L e usando 125 mL de hexano como solvente.

Com excepção do etanol que não foi extraído, para todos os outros compostos a extracção pode considerar-se completa após 30 minutos.

Tabela 2. Eficiência de extracção (% por SDE, em função do tempo (Schultz *et al.*, 1977).

Composto	Tempo de extracção (minutos)			
	10	30	60	120
Butirato de etilo	93	96	95	96
Hexanoato de etilo	97	101	100	100
Octanoato de etilo	99	101	101	100
Etanol	0	0	0	0
1-Hexanol	77	97	99	99
Linalol	93	100	99	100
Carvona	65	95	99	100
Limoneno	96	99	99	98

Os autores avaliaram ainda o efeito do solvente na eficiência de extracção e compararam a eficiência do processo quando realizado a pressão atmosférica e a pressão reduzida. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.

Não se verificaram diferenças significativas nas eficiências de extracção, com excepção do etanol. Eficiências semelhantes foram obtidas para a extracção a pressão atmosférica e reduzida, excepção feita para o 3-hidroxi-hexanoato de etilo, cuja volatilidade diminui a temperaturas mais baixas (menor volatilidade a pressão reduzida).

Tabela 3. Estudo da influência da pressão e do solvente na eficiência de extração (%) por SDE. (Schultz *et al.*, 1977)

Tempo	1 h			
Pressão	Atmosférica			100 mm Hg
Solvente	Hexano	Pentano	Éter Etílico	Hexano
pH	5,0	5,0	5,0	5,0
Butirato de etilo	99	101	97	100
Hexanoato de etilo	101	102	99	103
Octanoato de etilo	100	102	100	100
3-Hidroxi-hexanoato de etilo	42	44	49	6
Etanol	0	0	58	0
1- Hexanol	100	102	100	98
Linalol	99	99	97	99
Citronelal	81	81	79	95
Carvona	98	99	97	92

Em 1981, Goodefroot *et al.*, desenvolveram um aparelho de menores dimensões, que permitiu realizar extrações usando um volume de solvente de 1 mL. O microextractor desenvolvido permitiu a injeção directa do extracto sem necessidade de remoção do solvente, reduzindo, deste modo, o tempo de operação e minimizando a ocorrência de perdas em compostos mais voláteis aquando da operação de concentração do extracto. Com um tempo de operação de 1 hora os autores conseguiram recuperações exaustivas, usando como solvente diclorometano à temperatura de 90°C, para os vários compostos de uma mistura teste, aquecida a 140°C. O desvio médio padrão relativo foi de 2,1%. Na tabela 4 apresentam-se os resultados obtidos para a eficiência de extração.

Tabela 4. Eficiências de extração (%) obtidas por SDE para a mistura teste. (Goodefroot *et al.*, 1981)

Composto	Eficiência (%)	Composto	Eficiência (%)
Hexanal	102	Acetofenona	104
α -Pino	97	Hexadecano	90
<i>trans</i> -2-Hexenal	113	Decanoato de etilo	-
<i>p</i> -Cimeno	100	Carvona	103
<i>cis</i> -3-Hexenol	100	Salicilato de metilo	96
<i>trans</i> -2-Hexenol	102	Álcool benzílico	70
Octanoato de etilo	97	Eugenol	94
1-Octeno-3-ol	101	Farnesol 1	102
Benzaldeído	106	Farnesol 2	94
Linalol	99	Benzoato de benzilo	90

Os óleos essenciais de lúpulo (*Humulus lupulus*), pimenta (*Piper nigrum*) e de uma planta ornamental (*Rhododendron simsii*) foram isolados, tendo os autores verificado que o teor máximo em óleo foi obtido ao fim de 1 hora. No caso particular de óleos não polares, óleos nos quais a fracção de monoterpenos e sesquiterpenos representam mais de 80%, o teor máximo em óleo foi obtido ao fim de 15 minutos.

Usando o microextractor desenvolvido por Goodefroot *et al.*, Bouseta e Collin (1995) quantificaram os voláteis de uma amostra de mel. Para optimização do processo extractivo os autores usaram uma mistura teste, aquecida a 140°C, contendo canfeno, β -pineno, *trans*-cariofileno, terpineol, verbenona, acetato de bornilo e benzaldeído com concentrações próximas de 1 mg/L. As extracções foram realizadas com diclorometano a 90°C. Na figura 2 apresentam-se os resultados obtidos para a optimização do tempo de extracção.

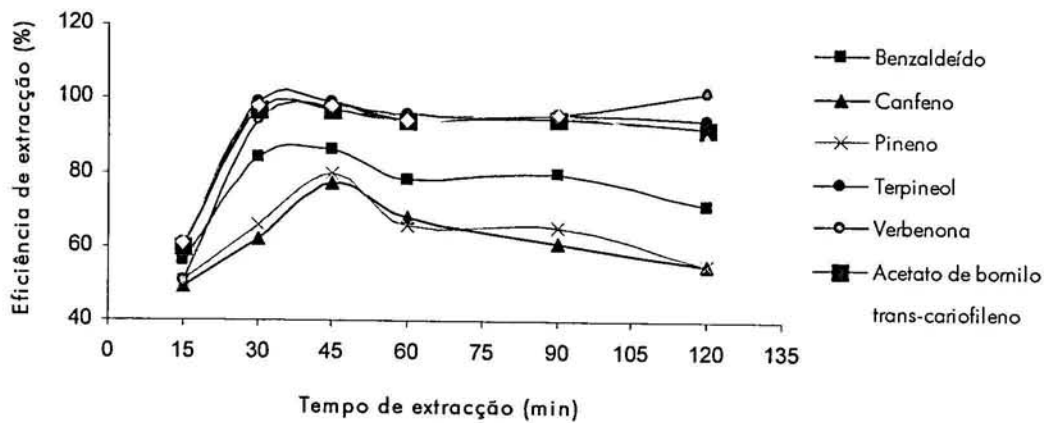


Figura 2. Estudo da eficiência de extração média em função do tempo de extração. (Bouseta e Collin, 1995)

Para a maioria dos compostos a extração máxima ocorreu ao fim de 30 minutos. Canfeno e β -pineno apresentaram valores de extração máximos, de 77 e 80% respectivamente, ao fim de 45 minutos. Verificou-se para estes dois compostos e para o benzaldeído uma diminuição da extração após os 45 minutos, o que é atribuído pelos autores a perdas durante a extração, uma vez que estes são os compostos mais voláteis. O que talvez possa também justificar o facto de estes serem, justamente, os compostos para os quais a eficiência de extração é menor. Bouseta e Collin avaliaram também a influência da temperatura de arrefecimento (temperatura no condensador) na eficiência de extração. Para temperaturas superiores a - 5°C, os autores verificaram diminuições significativas na extração de todos os compostos.

No caso dos compostos mais voláteis a temperatura óptima foi -10°C . Os resultados apresentam-se na figura 3.

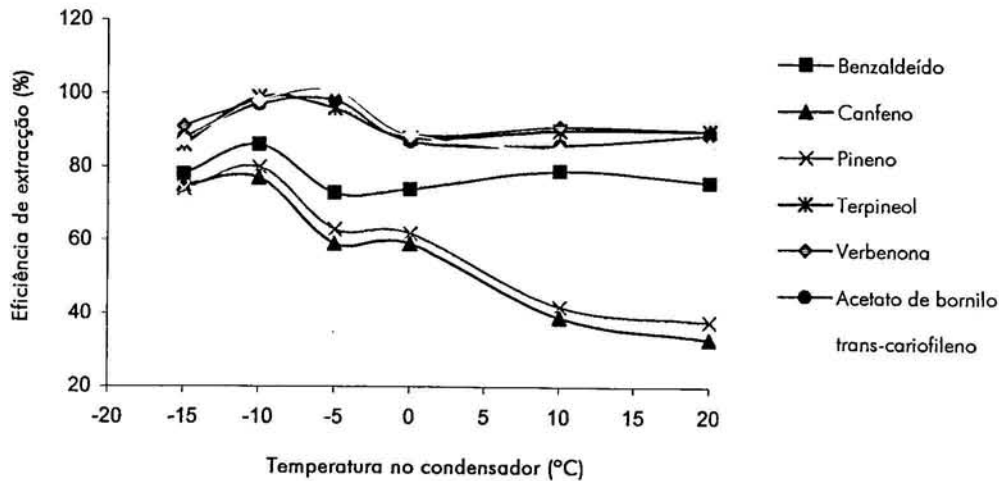


Figura 3. Estudo da eficiência de extração média em função da temperatura de arrefecimento no condensador. (Bousesta e Collin, 1995)

Com o objectivo de minimizar possíveis oxidações, Bousesta e Collin realizaram as extracções sob uma atmosfera inerte de azoto. Este parâmetro foi também optimizado tendo concluído os autores que um fluxo de 2 mL/min de azoto tinha um efeito favorável nas eficiências de extração do canfeno, β -pineno e benzaldeído.

A influência na eficiência de extração de parâmetros tais como, a temperatura de aquecimento do solvente e da fase aquosa contendo a amostra tem também sido avaliada. Por exemplo Blanch *et al.*, (Blanch *et al.*, 1993, citado por Chaintreau, 2001) usando o método modificado Simplex optimizaram a recuperação média em 18 passos, para quatro variáveis, temperatura dos banhos da amostra e do solvente, temperatura no condensador e tempo de extração. Careri *et al.*, 1999, usaram uma série de experiência baseadas no modelo de cubo de faces centradas, optimizaram a temperatura dos banhos da amostra e de solvente e tempo de extração. Ambos os estudos permitiram concluir que:

- As recuperações dependem da volatilidade e solubilidade dos analitos no solvente.
- Elevadas temperaturas de solvente levam a uma diminuição da eficiência de extração, provavelmente associada a perdas.
- O tempo de extração diminui com o aumento da temperatura da amostra.

A optimização das condições de extracção por SDE pode ainda ser avaliada através da utilização de modelos matemáticos. O primeiro modelo teórico foi proposto por Rijks *et al.*, em 1983, após algumas simplificações os autores chegaram à seguinte expressão para a eficiência de extracção do soluto em função do tempo de extracção (t):

$$R = \frac{1}{C_1 - C_2} \left\{ C_1 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{C_1}\right) \right] - C_2 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{C_2}\right) \right] \right\} \quad (1)$$

em que,

$$C_1 = \frac{W}{F_w} \left(\frac{p_T}{p_i^0 \gamma_i^w} \right) T_w \quad (2) \quad \text{e} \quad C_2 = \frac{w}{F_s} \quad (3)$$

F_s	Fluxo de solvente
F_w	Fluxo de vapor
k_w	Coefficiente de distribuição ar/água
k_s	Coefficiente de distribuição ar/solvente
K	Coefficiente de distribuição solvente/água
P_T	Pressão total
P_i^0	Pressão de vapor do analito i
R	Eficiência de extracção/Recuperação
S	Volume de solvente no balão
s	Volume de solvente no separador
T_w	Temperatura da amostra
W	Volume de água no balão
w	Volume de água no separador
γ_i^w	Coefficiente de actividade do analito i

De acordo com a equação (1), a eficiência de extracção é independente da concentração dos compostos na amostra. Esta análise foi confirmada por resultados experimentais (Rijks *et al.*, 1983). O tempo de operação assume grande influência na eficiência de extracção, particularmente para compostos com elevado ponto de ebulição. A eficiência de extracção não depende só dos coeficientes de actividade na solução aquosa, mas também do coeficiente de distribuição entre as duas fases, que por sua vez depende do tipo de solvente. O modelo é no entanto baseado em três simplificações:

- A extracção ocorre no condensador e não no separador.
- A extracção é quantitativa, exaustiva ($K \rightarrow \infty$).
- Os analitos não sofrem redestilação ($K_s \rightarrow 0$).

Pollien e Chaintreau apresentaram em 1997 um outro modelo, onde consideraram a possibilidade de redestilação dos analitos muito voláteis e a possibilidade de extracção parcial (Pollien e Chaintreau, 1997).

$$R = \frac{k_w SK}{k_w SK + k_s W} \left[1 - e^{-\frac{(k_w SK + k_s W) F_s F_w t}{WS(F_w + KF_s)}} \right]$$

F_s	Fluxo de solvente
F_w	Fluxo de vapor
k_w	Coeficiente de distribuição ar/água
k_s	Coeficiente de distribuição ar/solvente
K	Coeficiente de distribuição solvente/água
R	Eficiência de extracção/Recuperação
S	Volume de solvente no balão
W	Volume de água no balão
t	Tempo

Utilizando o modelo proposto os autores avaliaram a influência dos parâmetros na recuperação. A temperatura da amostra e do solvente (isto é os seus fluxos), a solubilidade dos analitos no solvente e a sua volatilidade demonstraram ser factores importantes. Este modelo forneceu suporte teórico para algumas das seguintes observações:

- A polaridade do solvente deve ser um compromisso, tendo em conta gama de polaridades dos analitos a extrair – um analito polar não será satisfatoriamente extraído por um solvente apolar.
- Compostos muito solúveis em água apresentam baixas volatilidades de modo que são pouco recuperados por SDE.

Em conclusão poderá afirmar-se que SDE possui um conjunto de características interessantes e que podem representar uma mais valia relativamente às restantes técnicas de extracção referidas. Os processos de extracção de óleos essenciais podem ser classificadas em duas categorias principais. Técnicas baseadas na solubilidade e técnicas baseadas na volatilidade dos analitos a extrair. As primeiras envolvem o contacto directo entre amostra e solvente (ex. extracção por solvente e SC-CO₂), resultando na co-extracção de compostos não voláteis, as segundas, baseadas na volatilidade (ex. destilação), não possuem esta desvantagem, mas, ou apresentam uma elevada quantidade de água nos extractos e uma consequente baixa concentração de voláteis ou

apenas isolam os compostos mais voláteis. O método de SDE apresenta com principal característica o facto de tirar vantagem de ambas as propriedades, volatilidade e solubilidade. Deste modo os extractos obtidos apresentam-se "mais limpos", (ausência de clorofilas e ceras) e dependendo do volume de solvente usado para a extracção, a remoção deste pode ser desnecessária sendo possível numa só operação extrair e concentrar o material volátil. Esta técnica permite ainda, de acordo com os estudos referenciados, mediante a optimização de alguns parâmetros obter elevadas eficiências de extracção para tempos de operação inferiores a 1 hora. O menor de tempo de operação representa uma importante vantagem, uma vez que o risco de ocorrência de perdas e degradação de compostos sensíveis ao calor é minimizado.

2.3 Composição Química dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas e altamente variáveis. Os seus constituintes podem ser divididos em dois grandes grupos caracterizados pela sua origem biogenética distinta, o grupo dos terpenos e o grupo menos comum dos compostos aromáticos derivados do fenilpropano, os fenilpropanóides (Bruneton, 1999).

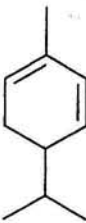
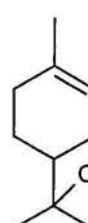
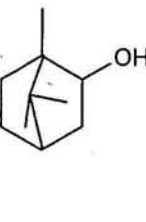
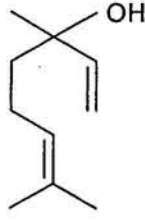
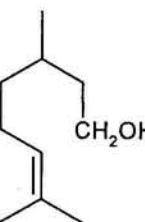
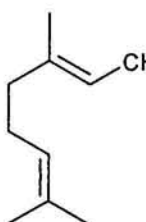
O estudo químico dos óleos essenciais iniciou-se no fim do século XVIII e princípio do século XIX. Fundamentais para a compreensão da composição dos óleos essenciais foram os estudos realizados entre 1880 e 1914 pelo cientista alemão Otto Wallach, em virtude dos quais viria a receber, em 1910, o Prémio Nobel da Química. Na altura em que Wallach se interessou pela composição dos óleos essenciais, era já conhecida a existência de hidrocarbonetos de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, designados de terpenos, por Kekulé, uma vez que foram identificados na terebintina. As substâncias com fórmulas moleculares $C_{10}H_{16}O$ e $C_{10}H_{18}O$, eram também já conhecidas e designadas sob o nome genérico de cânfora, substância conhecida desde a Antiguidade no Oriente e pelo menos desde o séc. XVII na Europa (Teisseire, 1994).

Desde a primeira publicação de Wallach de uma lista de nove terpenos, o número de estruturas de terpenos naturais identificadas aumentou substancialmente de tal modo que associando os monos, sesqui, di, tri, e politerpenos, estes números ascendem aos milhares, tendo sido isolados não só em plantas mas também em fungos, organismos marinhos e até em insectos (Hill, 1993).

A fracção terpénica nos óleos essenciais é constituída por, compostos de fórmula geral $C_{10}H_{16}$, vulgarmente designados monoterpenos, compostos de fórmula geral $C_{15}H_{24}$, os sesquiterpenos, e por compostos oxigenados derivados de ambos, nos quais se encontram representados todos os grupos funcionais conhecidos (Teisseire, 1994; Bruneton, 1999).

Correntemente divididos por 40 famílias de acordo com o seu esqueleto de carbono, o número de monoterpenos conhecidos é superior a um milhar (Bruneton, 1999). Eles podem ser acíclicos, monocíclicos, bíciclicos ou tricíclicos. Por vezes constituem mais de 90% do óleo, como por exemplo no caso do óleo de citrinos (limoneno) e de terebintina (pineno). Na tabela 5 apresentam-se alguns exemplos de monoterpenos comuns em óleos essenciais

Tabela 5. Exemplos de monoterpenos cíclicos e acíclicos presentes em óleos essenciais.

			
α -Felandreno	Mirceno	α -Terpineno	Limoneno
			
α -Pineno	3-Careno	Mentol	α -Terpeniol
			
Borneol	Linalol	Citronelol	Geraniol

Os hidrocarbonetos cíclicos terpênicos são constituintes vulgares dos óleos essenciais. Geralmente contribuem pouco para o aroma do óleo, são no entanto importantes como

matéria-prima na síntese de outros compostos com importância odorífica. Exemplos de hidrocarbonetos cíclicos terpênicos são o limoneno, α -terpineno, α -felandreno, mirceno.

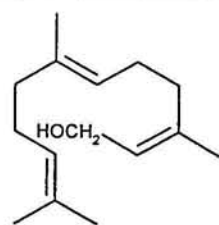
Dos hidrocarbonetos terpênicos bicíclicos, os pinenos são os mais importantes do ponto de vista industrial. A forma α -pineno é obtida por destilação do óleo de terebintina. A sua maior importância reside no seu uso como matéria-prima na síntese industrial.

Os álcoois acíclicos terpênicos ocorrem em muitos óleos essenciais. Estes álcoois foram inicialmente isolados a partir dos óleos onde eram os principais constituintes. Correntemente são obtidos, principalmente, por síntese industrial, no entanto o odor dos produtos sintéticos difere do odor dos compostos isolados a partir de fontes naturais.

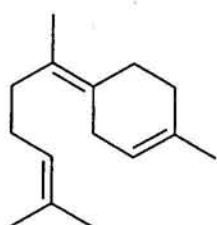
Os álcoois terpênicos acíclicos, geraniol, linalol, citrionelol estão entre os mais importantes e utilizados em fragrâncias (Calkin e Jellinek, 1994).

Particularmente exponencial tem sido a identificação de sesquiterpenos. Estes encontram-se distribuídos por mais de 100 famílias (Bruneton, 1999). São constituintes comuns dos óleos essenciais contribuindo para as propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos onde ocorrem. Do ponto de vista biológico um número considerável de sesquiterpenos são fitoalexinas, outros parecem actuar como reguladores do crescimento, para atrair insectos ou como defesa (Bruneton, 1999). Vários sesquiterpenos cíclicos de diversas estruturas têm sido isolados a partir dos óleos essenciais. Farnesol e nerolidol são exemplo de dois álcoois sesquiterpênicos usados frequentemente em composições de perfumes. Apresentam-se na tabela 6 alguns sesquiterpenos presentes em óleos essenciais.

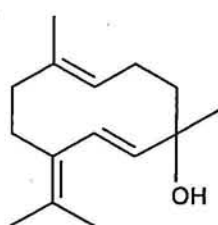
Tabela 6. Exemplos de sesquiterpenos acíclicos e cíclicos presentes em óleos essenciais.



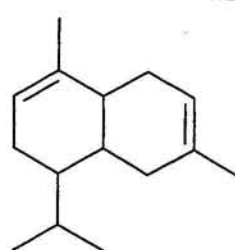
Farnesol



δ -Bisaboleno



Nerodiol



α -Cadineno

Do ponto de vista odorífico, a contribuição dos hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos para o aroma é muito pequena. Têm tendência a oxidar-se e polimerizar com alguma

facilidade, sendo por vezes removidos dos óleos para lhes conferir maior estabilidade e aumentar o poder odorífico por concentração dos compostos oxigenados.

Apesar da sua importância os terpenos são, em alguns óleos essenciais, constituintes minoritários. Este é, por exemplo, o caso dos óleos essenciais de anis, manjeriço, louro, folhas e casca da canela, cravo-da-índia, pimento sassafrás, tomilho, orégão, ylang-ylang, entre outros. Estes óleos essenciais apresentam como principais constituintes substâncias designadas por fenilpropanóides (C_6-C_3) (Teisseire, 1994; Bruneton, 1999). A formação destes compostos nas plantas é o resultado de um mecanismo biossintético completamente diferente do terpenóide. Alguns destes compostos são alelopáticos e estão envolvidos nas interações planta-insecto. Entre os mais comuns destacam-se o eugenol o anetol e aldeído cinâmico. Apresentam-se na tabela 7 alguns exemplos de compostos aromáticos comuns em óleos essenciais.

Tabela 7. Exemplos de compostos aromáticos presentes em óleos essenciais.

Eugenol	Anetol	Aldeído cinâmico
Safrol	Cumarina	Vanilina

Encontram-se também nos óleos essenciais uma miscelânea de outros compostos, sendo alguns deles resultantes da degradação sofrida durante o processo extractivo.

Compostos resultantes da degradação (oxidação) de ácidos gordos, tais como o ácido linoleico, com formação de álcoois, aldeídos e ésteres; compostos resultantes da degradação dos terpenos; as iononas, resultantes da autoxidação dos carotenos; as ironas (cetonas C_{14}), formadas pela oxidação dos triterpenos bicíclicos.

2.3.1 Factores de Variabilidade da Composição Química dos Óleos Essenciais

Um aspecto importante, que deve estar presente quando se fala em composição química de um óleo essencial é o que está relacionado com a influência dos factores ambientais, do processo extractivo e da origem botânica na composição química do óleo.

Um dos factores responsáveis pela variabilidade da composição química dos óleos essenciais é a existência de quimiotipos. A ocorrência de quimiotipos ou variedades químicas é muito frequente em plantas contendo óleos essenciais. Caracteriza-se pela existência, entre uma espécie vegetal, de indivíduos que apesar de indiferenciáveis morfológicamente, pertencendo portanto à mesma população, produzem óleos essenciais de diferente composição química. Esta variabilidade na composição química traduz-se, normalmente, numa acentuada diferença quantitativa. Uma das melhores ilustrações deste fenómeno verifica-se entre as espécies do género *Thymus* (Guillén e Manzanos, 1998; Pereira *et al.*, 2000).

O ciclo vegetativo, isto é o estado de desenvolvimento da planta, é também um dos parâmetros responsável pela variabilidade na composição química. Como exemplo temos os óleos essenciais de hortelã-pimenta e de tomilho (Rohloff, 1999; Hudaib *et al.*, 2002).

Muito importante é também a influência dos factores ambientais. A temperatura, humidade relativa, período de exposição à luz (fotoperíodo) e padrões de vento exercem uma influência directa, em particular nas espécies que possuem estruturas histológicas de armazenagem à superfície (tricomos glandulares nas *Lamiaceae*), quando a sua localização é mais interior a qualidade do óleo é mais constante. No caso da hortelã-pimenta sabe-se que dias longos e temperaturas nocturnas mais elevadas favorecem o aumento em teor de óleo (Bruneton, 1999). A composição química é ainda dependente do tipo de material colhido, isto é se são flores, folhas, ramos e raízes (Das *et al.*, 2002) e dos processos extractivos utilizados na obtenção do óleo (Bruneton, 1999). A utilização de diferentes processos de extracção, conduz, normalmente, a produtos finais de composição distinta, pelo que os métodos utilizados devem ser ponderados quando se pretendem comparar resultados.

2.4 Análise dos Óleos Essenciais – Técnicas Analíticas

A avaliação da qualidade de um óleo essencial passa pela determinação de um conjunto de parâmetros como a cor, a fluidez, o aroma, mas principalmente pelo conhecimento da sua composição qualitativa e quantitativa. A determinação exaustiva da composição dos óleos essenciais é uma tarefa particularmente difícil e que requer a utilização de um conjunto de técnicas de separação e identificação muito sofisticadas, uma vez que estes são, de um modo geral, misturas muito complexas. A presença nestas misturas de centenas de constituintes, maioritariamente de natureza terpénica, representando diversos grupos funcionais e a ocorrência de inúmeros isómeros bem como a frequente existência de uma grande diferença na proporção dos vários constituintes, tem representado um constante desafio na investigação dos óleos essenciais.

A técnica mais utilizada e que tem demonstrado ser particularmente bem adaptada para a análise dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa (GC). O desenvolvimento de colunas capilares conferiu-lhe um enorme poder de separação, indispensável para análise de misturas complexas. No entanto a utilização de uma única coluna ou fase estacionária não é, por vezes, suficiente para conseguir a separação de todos os constituintes de um óleo essencial (Marriott *et al.*, 2001). A proximidade dos índices de retenção de certos compostos não permite que sejam separados, sendo muito provável a ocorrência de sobreposição inviabilizando ou condicionando a correcta identificação e quantificação dos compostos. Nestes casos a utilização de duas colunas com fases estacionárias diferentes, uma de natureza apolar vulgarmente de metilsilicone/polidimetilsiloxano e outra de natureza polar normalmente de polietilenoglicol, torna-se necessária (Marriott *et al.*, 2001; Lockwood, 2001).

Uma outra abordagem, que têm vindo a ser desenvolvida, é a que recorre a cromatografia gasosa multidimensional (MDGC). Neste tipo de sistemas cromatográficos são utilizadas duas colunas ligadas entre si por uma válvula. Os componentes que apresentam uma pobre resolução são transferidos para uma segunda coluna, com uma fase estacionária diferente, que permite a sua separação. O procedimento típico consiste em isolar uma região ou regiões específicas, isto é executar um corte, "heartcut", numa secção/região do cromatograma contendo os compostos que eluem da primeira coluna mal resolvidos e transferi-los para a segunda coluna (Marriott *et al.*, 2001). Bastante promissora, em

particular pelo elevado poder de resolução que tem associado é a técnica de cromatografia gasosa bidimensional (GCxGC). À semelhança da cromatografia multidimensional também neste sistema são utilizadas duas colunas mas com uma diferença fundamental é que toda a amostra percorre e é separada nas duas colunas (Marriott *et al.*, 2001). A utilização desta técnica na análise de óleos essenciais tem contribuído para o aumento do número de compostos identificados (Lockwood, 2001).

A abordagem mais frequente e alternativa a estes métodos recentes e sofisticados, que utilizam mais do que uma coluna, de modo a ser possível atingir a separação desejada, reside no fraccionamento do óleo essencial antes da análise cromatográfica. Um dos processos mais utilizados para o fraccionamento é o da cromatografia preparativa em coluna, com sílica-gel, na qual a separação é obtida através da manipulação da granulometria da fase estacionária e da polaridade da fase móvel (solventes). Também utilizada no fraccionamento de óleos essenciais tem sido a cromatografia líquida de alta resolução, HPLC preparativa. Uma das vantagens desta técnica reside na possibilidade de acoplamento ao cromatógrafo gasoso (HPLC-GC), sendo possível automatizar o processo (Marriott *et al.*, 2001; Lockwood, 2001).

Na detecção e quantificação de terpenos em óleos essenciais o detector mais usado tem sido o de ionização de chama – FID (Lockwood, 2001). No entanto a reconhecida complexidade da maioria dos óleos essenciais pode dificultar a identificação dos seus constituintes baseada apenas nos tempos de retenção ou nos índices de retenção. A associação da cromatografia gasosa com técnicas espectroscópicas permite eliminar ou reduzir a incerteza na identificação dos compostos. A técnica mais comum resulta do acoplamento do cromatógrafo gasoso com o espectrómetro de massa, GC-MS, mas também útil é a associação do cromatógrafo gasoso com a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, GC-FTIR (Buchbauer *et al.*, 1997; Marriott *et al.*, 2001; Lockwood, 2001). A utilização de GC-FTIR permite ultrapassar uma das principais limitações do espectrómetro de massa, a distinção entre alguns isómeros (Ragunathan *et al.*, 1999). Uma vez que estes podem apresentar espectros de massa muito similares a sua correcta identificação pode ser bastante ambígua. A associação GC-FTIR-MS tem se revelado muito útil na análise de misturas tão complexas como são, por vezes, os óleos essenciais.

A informação espectral fornecida por estas técnicas (GC-MS e GC-FTIR) em associação com a informação sobre os tempos de retenção ou os índices de retenção diminui significativamente a incerteza na identificação da maioria dos compostos. No entanto para o caso particular dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos, que apresentam espectros de massa praticamente idênticos a identificação é bastante problemática. (Marriott *et al.*, 2001; Lockwood, 2001). A identificação inequívoca destes compostos requer normalmente a utilização de outros métodos espectroscópicos tais como a ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e de carbono -13 (^{13}C -RMN).

Uma outra técnica com importância para a análise de óleos essenciais é a cromatografia gasosa associada à avaliação organoléptica, o GC-Sniffing (Buchbauer *et al.*, 1997). Nesta técnica o fluxo à saída da coluna é dividido, seguindo uma parte para o detector (normalmente FID) e a outra para avaliação odorífica por parte de um aromista treinado. Este é um método bastante útil na identificação de qual ou quais os compostos responsáveis pelo odor característico pressentido.

Também importante para análise de óleos essenciais tem sido o desenvolvimento de colunas capazes de separar enantiómeros, colunas quirais. O estudo da composição enantiómera terpénica assume particular importância na autentificação dos óleos essenciais (Marriott *et al.*, 2001).

Paralelamente às técnicas acima referidas tem encontrado também aplicação no estudo da composição dos óleos essenciais o processo de microextração em fase sólida, SPME. Aliada à sua notória simplicidade está a capacidade de isolar e concentrar os constituintes de uma amostra, sendo capaz de eliminar interferentes ou contaminantes do processo de análise. Tendo sido a técnica escolhida neste trabalho para a preparação e introdução da amostra para a análise por cromatografia gasosa, faz-se no capítulo seguinte uma descrição mais detalhada.

2.4.1 Microextração em Fase Sólida – SPME

Uma das fases cruciais de um procedimento analítico é sem dúvida a preparação da amostra. Idealmente esta deveria ser de execução fácil, não recorrer a solventes orgânicos, ser capaz de simultaneamente separar e concentrar os componentes da amostra. Microextração em fase sólida, SPME, é uma técnica que preenche estes requisitos. Num único passo é possível extrair, concentrar e introduzir a amostra para análise instrumental num GC, GC-MS ou HPLC.

O elemento fundamental deste processo reside numa pequena fibra de sílica (1cm de comprimento) que suporta uma fase estacionária semelhante às utilizadas em cromatografia gasosa. O seu pequeno tamanho e geometria cilíndrica permite que seja acoplada a um dispositivo muito semelhante a uma seringa, podendo deste modo ser directamente introduzida na porta de injeção do cromatógrafo. A simplicidade do seu manuseamento é uma das vantagens que apresenta e que tem contribuído para o seu desenvolvimento desde que nos inícios dos anos 90 foi introduzida por Janusz Pawliszyn.

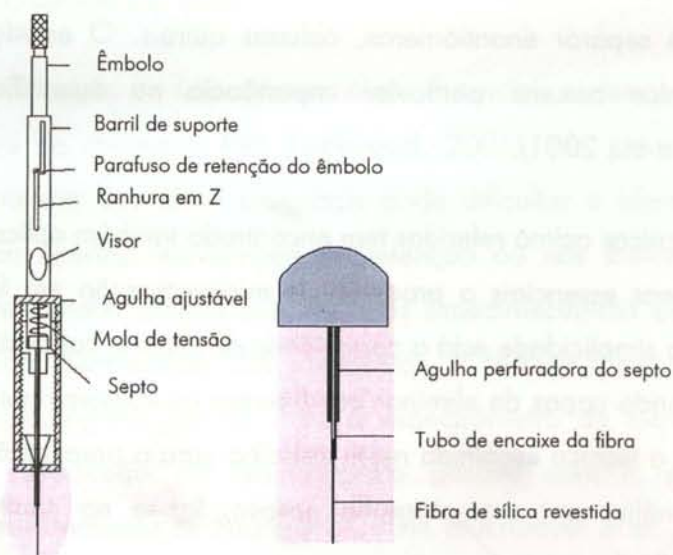


Figura 4. Dispositivo de análise por SPME. (adaptado de Supelco)

O procedimento experimental de microextração em fase sólida é muito simples. A fibra que suporta a fase estacionária está inserida na agulha da seringa e após esta ter perfurado o septo do “vial”, é exposta à amostra, durante um tempo pré – determinado por acção do êmbolo da seringa. Após a extração a fibra é recolhida no interior da

agulha (evitando-se a perda dos analitos) e é directamente transferida para o injector do cromatógrafo, onde os componentes extraídos são termicamente desorvidos.

A eficiência de extracção é determinada pelas propriedades dos analitos (polaridade e volatilidade), tempo e temperatura de extracção, propriedades da fibra (espessura e polaridade), pH e força iónica da amostra (Pawliszyn, 1997).

A extracção pode ser realizada directamente na amostra (imersão da fibra na solução) ou no *headspace* da amostra. Optar por um ou outro método depende das características da amostra. De um modo geral se os analitos se encontram predominantemente na fase aquosa (reduzida pressão de vapor) a imersão na amostra será preferível à técnica de *headspace* e vice-versa (Pawliszyn, 1997).

2.4.1.1 Alguns fundamentos teóricos

De um modo geral o processo de extracção SPME considera-se completo quando se estabelece o equilíbrio entre a amostra e a fase estacionária, isto é quando a quantidade de analito extraída se mantém constante ao longo do tempo.

Para um sistema no qual o *headspace* esteja ausente a quantidade extraída pela fase estacionária, no equilíbrio, pode ser descrita pela seguinte expressão:

$$n = \frac{k_{fs} V_f V_s C_0}{V_s + k_{fs} V_f}$$

onde n é o número de moles extraído pela fibra, K_{fs} a constante de distribuição fibra/amostra, V_f o volume da fibra, V_s o volume da amostra e C_0 a concentração inicial de um dado componente na amostra (Zhang *et al.*, 1994; Pawliszyn, 1997).

A equação permite verificar a existência de uma relação linear entre a quantidade de analito extraída a sua concentração inicial na amostra, o que permite a sua quantificação (Zhang *et al.*, 1994).

As fases estacionárias possuem forte afinidade para os compostos orgânicos, (K_{fs} elevados), o que permite uma elevada concentração destes na fibra, no entanto, e de um modo geral, esta não é suficientemente elevada para garantir a extracção completa dos analitos. Nesta técnica estabelece-se o equilíbrio entre a quantidade extraída pela fibra e o

que fica na amostra. De modo que, só através de uma calibração se pode determinar a concentração dos analitos na amostra. (Pawliszyn, 1997).

Analisando a equação verifica-se que à medida que aumenta o volume da amostra V_s , também aumenta o número de moles extraído n , até que o volume da amostra se torna significativamente superior ao produto da constante de distribuição pelo volume do revestimento (capacidade da fibra: $V_f k_{fs} \ll V_s$). Neste ponto, a sensibilidade do método não aumenta com o aumento do volume da amostra, reduzindo-se a equação anterior:

$$n = k_{fs} V_f C_0$$

Nestas condições a quantidade de analito a extrair é independente do volume da amostra. Esta implicação é muito importante pois permite análises em campo. A fibra pode ser exposta ao ar, poços, lagos ou rios, deixando de ser necessária a recolha da amostra para análise (Pawliszyn, 1997).

A cinética de extracção é um parâmetro muito importante, uma vez que determina a velocidade de extracção. Esta é controlada pela difusão do analito da amostra para o revestimento da fibra. Para amostras perfeitamente agitadas verifica-se que a velocidade de transferência de massa está limitada pela difusão dos analitos na fase estacionária. Neste caso o equilíbrio pode ser atingido para tempos de exposição inferiores a um minuto. Esta rápida extracção é garantida porque a fase estacionária é muito fina (10 a 100 μm). Na prática isto verifica-se apenas para amostras gasosas nas quais os coeficientes de difusão são elevados. Para amostras líquidas isto não é possível, excepto em condições de agitação muito forte, o que não é garantido pela agitação magnética, sendo portanto necessário mais tempo para se atingir o equilíbrio entre fases. A camada ou barreira de água que envolve a fibra dificulta a difusão (Pawliszyn, 1997).

O tempo necessário para se atingir o equilíbrio será portanto maior quanto maior o a constante de distribuição do analito (K_{fs}), pois maior quantidade de analito tem que atravessar a camada de água para atingir a fase estacionária. Nestas condições a extracção em *headspace* permite reduzir o tempo para a extracção, uma vez que os coeficientes de difusão dos analitos na fase de vapor são maiores do que na fase aquosa (Zhang e Pawliszyn, 1993, Zhang *et al.*, 1994; Pawliszyn, 1997).

Em *headspace* três fases estão envolvidas (fase estacionária, *headspace* e a amostra) a expressão que traduz a quantidade extraída pela fibra (fase estacionária) no equilíbrio, é:

$$n = \frac{k_{fs} V_f V_s C_0}{V_s + k_{fs} V_f + K_{hs} V_g}$$

onde n é o número de moles extraído pela fibra, K_{fs} a constante de distribuição fibra/amostra, V_f o volume da fibra, V_s o volume da amostra e C_0 a concentração inicial de um dado componente na amostra, V_g o volume do *headspace*, K_{hs} a constante de distribuição do analito entre o *headspace* e a matriz da amostra

A velocidade de extracção pode ser acelerada aumentando a pressão de vapor dos componentes aquecendo a amostra. À medida que a temperatura aumenta mais analitos são libertados para o *headspace* o que favorece a extracção, no entanto para temperaturas elevadas a fibra começa a perder a sua capacidade para extrair os analitos (a constante de distribuição fibra/amostra diminui - K_{fs}). Existe uma temperatura óptima para a extracção. A agitação também pode contribuir para o aumento da velocidade do transporte de massa, diminuindo o tempo para extracção (Zhang et al., 1994; Pawliszyn, 1997).

2.4.1.2 Optimização dos parâmetros SPME

A extracção SPME não é, como já foi referido, uma técnica de extracção exaustiva, mas uma técnica de equilíbrio entre as fases envolvidas. A quantidade de analito extraída pela fibra é função da cinética do processo e da constante de distribuição fibra/amostra, K_{fs} . Deste modo SPME é particularmente sensível às condições experimentais. A alteração das condições experimentais influencia K_{fs} e a extracção, alterando a quantidade extraída pela fibra. Esta particularidade representa simultaneamente uma vantagem e desvantagem. Se por um lado é possível melhorar e ajustar o método, alterando as condições, é preciso que uma vez que estas estejam definidas e optimizadas se mantenham durante a análise de modo a garantir a reprodutibilidade.

A selecção do tipo de fibra a usar deve ter em conta a polaridade, volatilidade e tamanho do analito a extrair. Compostos não polares serão preferencialmente extraídos por fibras

não polares, uma vez que a matriz e o fibra “competem” pelo analito, quanto maior a afinidade entre o analito e a fibra melhor. Fibras de características mais polares extraem preferencialmente compostos polares. Fibras com maior espessura (100 μm) são melhores para compostos voláteis, mas também podem ser usadas para compostos menos voláteis, requerem no entanto tempos de extracção mais longos e há o risco destes não serem totalmente desorvidos afectando extracções sucessivas, *carryover*. Fibras com menor espessura serão mais indicadas para estes compostos, uma vez que garantem difusão mais rápida e dessorção também mais rápida. Quanto maior a espessura da fibra maior quantidade de analito será extraída, maior sensibilidade (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000). Apresenta-se na tabela 8 o conjunto de fibras disponíveis comercialmente e as suas principais características.

Tabela 8. Fibras de SPME disponíveis comercialmente.

Fibras não polares	Tamanhos
PDMS - Polidimetilsiloxano	100 μm , 30 μm , 7 μm
Fibras polares	Tamanhos
PA - Poliacrilato	85 μm
CW-DVB - Carbowax-divinilbenzeno	65 μm
CW-TPR- Carbowax- Templated resin	50 μm só para HPLC
Fibras Mistas	Tamanhos
PDMS-DVB	65 μm ,
PDMS-DVB	60 μm só para HPLC
DVB- Carboxen™ - PDMS	30 μm , 50 μm
Carboxen™ - PDMS	75 μm

Duas das fibras mais usadas e versáteis são as de polidimetilsiloxano (PDMS) e de poliacrilato (PA). PDMS é uma fibra não polar, bastante eficaz na extracção de analitos não polares. Pode no entanto ser usada com eficácia na extracção de compostos polares mediante optimização das condições de extracção (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000). O revestimento da fibra tem um aspecto rugoso, favorecendo a retenção dos analitos, uma vez que a extracção se dá por absorção e a espessura de revestimento que retém os compostos. PA é uma fibra de características polares. Os coeficientes de difusão dos analitos nesta fase são menores quando comparados com PDMS, resultando em tempos de extracção superiores (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000).

Fibras porosas (com revestimento de divinilbenzeno (DVB) ou Carboxen) retêm compostos de dimensões reduzidas, sendo ideais para compostos com 2 a 6 átomos de carbono. Ambas as fibras podem saturar com facilidade, apresentando uma menor gama de linearidade. Nas fibras contendo DVB verifica-se também, em particular para concentrações mais elevadas, competição entre analitos (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000).

O modo de extracção depende das características da amostra, da volatilidade dos analitos e da sua afinidade para a matriz. Para amostras muito sujas ou contendo substâncias capazes de danificar a fibra ou de modificar as suas propriedades a extracção em *headspace* é a melhor opção. Quando a reduzida volatilidade dos compostos não permite a extracção em *headspace* é possível proceder à extracção por imersão protegendo a fibra com uma membrana (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000). Para amostras limpas a extracção por imersão deve ser considerada. No entanto se os analitos a extrair forem voláteis será preferível realizar a extracção em *headspace*. Uma vez que, como já foi referido, os coeficientes de difusão dos analitos em meio gasoso são superiores aos verificados em fase líquida a extracção em *headspace* permite reduzir ao tempo de extracção (Pawliszyn, 1997). O modo de extracção em *headspace* permite ainda modificações na matriz, tais como mudanças no valor do pH e força iónica, sem danificar a fibra (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000; Kataoka *et al.*, 2000).

Em ambos os modos de extracção é importante assegurar uma consistente agitação da amostra pois esta permite reduzir o tempo de extracção, especialmente para analitos com elevado peso molecular e elevados coeficientes de difusão (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000; Kataoka *et al.*, 2000). No caso de SPME directa, isto é por imersão da fibra na amostra, a agitação permite diminuir a resistência à difusão que representa a camada estática de solução que rodeia a fibra. Em *headspace* a agitação favorece a difusão dos analitos da fase aquosa para a fase gasosa.

Com o objectivo de melhorar a eficiência de extracção é frequente proceder a alterações nas características da matriz, uma vez que os coeficientes de distribuição dos analitos são parcialmente dependentes da interacção analito/matriz (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000; Kataoka *et al.*, 2000). A adição de sal a amostras aquosas é um procedimento comum e que permite alterar a força iónica da solução e reduzir a solubilidade de alguns compostos. Esta abordagem deve no entanto ser avaliada caso a caso pois o efeito inverso

(aumento de solubilidade) também se pode verificar (Pawliszyn, 1997). Alterações de pH permitem também alterar a solubilidade, os componentes básicos e ácidos são mais eficientemente extraídos a pH básico e ácido, respectivamente. A combinação destes dois parâmetros (adição de sal e pH) é particularmente útil para aumentar a sensibilidade da extracção em *headspace*.

Parâmetro igualmente importante na extracção em *headspace* é a temperatura de extracção. A temperatura afecta a quantidade extraída de analito (sensibilidade do método) e a cinética de extracção. O aumento de temperatura permite libertar mais analitos da matriz para o *headspace*, resultando numa maior concentração destes no *headspace* o que favorece a extracção, mas diminui simultaneamente K_f , a constante de distribuição fibra/amostra (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000). Como regra poderá estabelecer-se como temperatura óptima de extracção a mais elevada temperatura que permita atingir a sensibilidade desejada para o método (Pawliszyn, 1997).

O tempo de extracção é outro factor do qual depende a quantidade de analito extraída. Se por um lado é verdade que a máxima sensibilidade é atingida no equilíbrio, não necessário atingir o equilíbrio para a análise apresentar reprodutibilidade e exactidão. (Ai, 1997). A relação de proporcionalidade existente entre a quantidade extraída e a concentração inicial do analito ao longo do processo extractivo, permite trabalhar em condições de não equilíbrio.

A precisão do método SPME está também dependente dos parâmetros de dessorção dos analitos. A temperatura da porta de injeção, profundidade de inserção da fibra no injector do sistema cromatográfico e o tempo de dessorção, devem ser optimizados e uma vez estabelecidos estes parâmetros devem manter-se. A dessorção dos analitos depende do ponto de ebulição, da espessura do revestimento da fibra e da temperatura da porta de injeção, é importante assegurar que não haja *carryover*. Importante é também proceder ao condicionamento da fibra antes de iniciar a sua utilização e sempre que se verifica aumento do ruído da linha de base, em particular quando existe risco de contaminação da fibra. Outros factores a manter também constantes são o tamanho do "vial", o volume da amostra e de *headspace* e a profundidade de exposição da fibra.

Não sendo SPME uma técnica de extracção exaustiva é de um modo geral necessário proceder à calibração para realizar a determinação quantitativa. Para matrizes simples ou

bem definidas a calibração externa pode ser utilizada. Para matrizes mais complicadas e difíceis de reproduzir a calibração externa poderá não funcionar devido a efeitos de matriz. Nestes casos a abordagem mais indicada é a calibração por padrão interno ou pelo método de adição padrão. No entanto para que o método de padrão interno funcione bem é necessário que as constantes de distribuição sejam semelhantes. Em alternativa, e para o caso de matrizes complexas poderá ser necessário utilizar como padrões internos os próprios analitos marcados isotopicamente (Pawliszyn, 1997).

2.4.1.3 Microextração em fase sólida de voláteis terpénicos

Uma das mais fortes aplicações desta técnica reside na determinação de poluentes orgânicos (COVs, PHAs, PCBs, BTEX, pesticidas) no ambiente e em particular em águas (Alpendurada, 2000). A determinação e monitorização de aromas/odores e a detecção de solventes orgânicos em produtos alimentares e farmacêuticos são aplicações nas quais SPME também apresentou vantagens. Promissora tem sido também a sua aplicação na detecção de drogas ilegais na urina e sangue (Pawliszyn, 1997).

Particular atenção é dada neste trabalho à aplicabilidade de SPME na detecção de voláteis terpénicos ou o que podemos de um modo genérico classificar de aromas. A análise destes compostos compreende, normalmente, uma etapa de preparação da amostra, na qual se procede à extracção/concentração das substâncias recorrendo a técnicas de *headspace* em modo estático ou dinâmico, purga e armadilha (*purge and trap*), extracção líquido/líquido, destilação/extracção. As principais desvantagens destes métodos residem na baixa sensibilidade, no tempo excessivo que exigem, no uso de solventes orgânicos e no risco de perdas e degradação de analitos.

Yang e Peppard (1994), num dos primeiros estudos realizados nesta área, aplicaram a técnica de microextração em fase sólida na análise de aromas voláteis em sumos de fruta e café. Os autores avaliaram a influência de alguns parâmetros na eficiência de extracção, utilizando para o efeito uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS – 100 µm) e uma mistura teste aquosa contendo, entre outros, compostos de natureza terpénica. Um dos parâmetros avaliados foi o da força iónica da solução. Para o efeito adicionaram sal à solução teste, tendo observado quatro comportamentos diferentes. Para a maioria dos compostos estudados (linalol, neral, benzaldeído, etc.) a extracção aumentava com o aumento do

teor de sal; para outros registava-se um aumento inicial mantendo-se posteriormente constante (geranial, acetato de etilo). Outros havia para os quais, ocorria um aumento inicial, seguido de diminuição à medida que o teor em sal aumentava (hexanoato de etilo, ácido hexanóico) e aqueles cuja quantidade extraída diminuía com o aumento do teor em sal (limoneno). Estes resultados demonstraram que o efeito da força iónica, "salting out", deverá ser avaliado caso a caso. Os autores verificaram que para amostragem em *headspace*, o aumento do volume de *headspace*, mantendo constante o volume de líquido provocava uma diminuição na quantidade extraída pela fibra. Concluindo que para uma maior sensibilidade o volume de *headspace* deve ser minimizado. Segundo os autores, quando comparada com o método tradicional de *headspace*, SPME revelou maior eficiência na extracção de compostos menos voláteis e menor eficiência para os altamente voláteis presentes numa amostra de café moído. Na análise de um sumo de fruta, SPME apresentou uma sensibilidade comparável e para alguns compostos (ésteres e terpenóides) superior à obtida por extracção com diclorometano do sumo.

A análise de aromas voláteis no *headspace* de sumos usando SPME foi também estudada por Steffen e Pawliszyn (1996). As condições de extracção foram optimizadas para uma solução aquosa teste. A fibra de poliacrilato (PA) apresentou uma maior eficiência de extracção, para os analitos em estudo (linalol, α -terpineol, etanol, etc.), quando comparada com a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS), excepção feita para os hidrocarbonetos terpénicos. Estes analitos (α -pineno, β -mirceno, γ -terpineno e limoneno) sendo não polares apresentaram uma maior afinidade para a fibra de natureza também não polar, PDMS. Os autores verificaram que devido à natureza do revestimento de poliacrilato (polímero cristalino) esta fibra necessita de um tempo de equilíbrio, na extracção, mais longo (cerca de 60 minutos), do que o requerido (30 a 40 minutos) com um revestimento de polidimetilsiloxano (líquido polimérico). O efeito da adição de sal (15, 36, 42% (m/v)) foi também avaliado com o objectivo de aumentar a eficiência de extracção. Com a excepção do α -pineno, para o qual a maior eficiência de extracção foi obtida na ausência de sal, a extracção de todos os outros compostos aumentou com o teor de sal. A gama de linearidade e os respectivos limites de detecção foram determinados para as condições de extracção optimizadas (36% (m/v), 60 minutos, fibra de PA) e são apresentados para alguns dos compostos em estudo na tabela 9.

Tabela 9. Limites de detecção e gama de linearidade de alguns voláteis, presentes no headspace de sumos de laranja, para a fibra de poliacrilato. (Steffen e Pawliszyn, 1996)

Composto	Gama linear SPME (mg/L)	Limite de detecção (mg/L)
	GC-FID	
Etanol	940-0,94	0,39
α -Pineno	0,084-0,00084	$2,7 \times 10^{-5}$
Linalol	0,77-0,00077	$4,1 \times 10^{-6}$
α -Terpineol	0,71-0,0071	$3,6 \times 10^{-7}$

Zhang *et al.* (1998) optimizaram as condições de microextração em fase sólida de compostos de aroma voláteis (α -pineno, limoneno, octanal, decanal e butirato de etilo) no headspace de sumos de laranja, utilizando uma fibra de PDMS. O estudo do efeito da temperatura e do tempo de extração foi realizado para uma gama de temperaturas compreendidas entre 25 e 80°C e para um tempo de extração compreendido entre 5 e 60 minutos. Os autores verificaram que o aumento da temperatura provocava uma diminuição na quantidade extraída, em contrapartida o tempo necessário para se atingir o equilíbrio diminuía com o aumento da temperatura. A optimização destes parâmetros conduziu aos valores de 60°C e 20 minutos para realização da extração. O estudo do efeito de matriz na extração foi efectuado por comparação entre a extração realizada com matriz aquosa e com o próprio sumo, previamente desodorizado. Em ambas as matrizes foi adicionada uma quantidade conhecida de limoneno e os resultados obtidos foram segundo os autores bastante diferentes. A calibração foi realizada usando a primeira matriz (sumo desodorizado) na qual foram adicionadas quantidades conhecidas dos compostos a analisar. Para o α -pineno a gama de linearidade obtida esteve compreendida entre 0,2 e 2 mg/L e 3,0% foi o valor encontrado para o desvio padrão relativo, nos ensaios de repetibilidade.

Miller e Stuart (1999) avaliaram as fibras de PDMS, PA, PDMS/DVB, CW/DVB e Carboxen na extração do headspace de sumos de fruta a 40°C e para uma exposição da fibra de 30 minutos. A extração por headspace estático (método tradicional) apresentou para os compostos em estudo (α -pineno, limoneno, linalol, α -terpineol, benzaldeído, etc.) baixa sensibilidade, sendo necessário proceder à concentração destes antes da extração. SPME

permitiu, segundo os autores melhorar significativamente a extracção. Para as cinco fibras estudadas PDMS/DVB provou ser, de um modo geral, mais eficiente na extracção dos compostos, seguida das fibras de PDMS, CW/DVB, PA e Carboxen. PDMS/DVB é uma fibra mista, constituída por um revestimento de PDMS de natureza não polar, e por DVB de natureza polar. Segundo os autores ambas as fibras (PDMS e PDMS/DVB) permitiram extracções semelhantes para os compostos não polares (α -pineno, limoneno, etc.), mas na extracção de compostos mais polares PDMS/DVB foi mais eficiente.

A caracterização dos compostos de aroma (linalol, citronelol, geraniol e nerol) em vinhos por SPME foi avaliada por Penton (1997). Os estudos realizados (para uma solução aquosa) permitiram concluir que a presença de etanol na matriz (nos vinhos o seu teor pode variar entre 8 a 20%) diminui a eficiência de extracção da fibra para os álcoois terpénicos. A adição de sal à matriz promoveu o aumento da eficiência de extracção já observado em estudos anteriores. Os álcoois terpénicos demonstraram maior afinidade para fibra de poliacrilato, no entanto a fibra de polidimetilsiloxano apresentou uma melhor precisão, talvez relacionada com o menor tempo necessário para atingir o equilíbrio. A quantificação destes compostos nos vinhos foi realizada por adição padrão, verificando-se existir um efeito de matriz função do teor de álcool presente.

A aplicação de SPME em *headspace* para a extracção de aromas voláteis em vinhos foi também estudada por Rocha *et al.* (2001). A optimização dos parâmetros de extracção foi realizada para uma matriz aquosa a 10% (v/v) em etanol, constituída por alguns álcoois, ésteres e os pelos monoterpénóides linalol e geraniol. Utilizando uma fibra de poliacrilato os autores avaliaram o efeito da agitação, da adição de sal (NaCl), da temperatura, tempo de exposição da fibra e volume de amostra, na eficiência de extracção. Os resultados permitiram verificar que a agitação da amostra favorece a eficiência de extracção, a quantidade de linalol e geraniol extraída aumentou de um factor de 3,1 e 2,5 respectivamente. De igual modo, a adição de sal à amostra teve como efeito um aumento na sensibilidade do método. A adição de 8 g de NaCl permitiu aumentar em 6,8 vezes o teor de linalol na fibra e em 3,1 vezes o de geraniol. O aumento da temperatura (25, 30, 40°C) favoreceu ligeiramente a extracção de geraniol, mas não teve efeito significativo na extracção de linalol. O tempo necessário para o equilíbrio ser atingido foi de quarenta e cinco minutos, para a amostra a 25°C e teor em sal de 8 g. O aumento no volume de amostra (20, 30, 40 mL) não levou, com excepção dos ésteres, a um aumento na

eficiência de extracção. A quantificação dos compostos, por SPME, demonstrou ser dependente da composição da matriz. Apresentam-se na tabela 10, para o linalol e geraniol, a gama de linearidade, os limites de detecção e os coeficientes de variação médios, determinados para as condições de condições de extracção optimizadas.

Tabela 10. Estudo de linearidade de alguns voláteis presentes no headspace de vinhos, para a fibra de poliacrilato. (Rocha et al., 2001)

Composto	Gama linear SPME (mg/L)	R ²	CV (%)
		GC-FID	
Linalol	0,30-4,22	0,9954	4,9
Geraniol	0,20-2,42	0,9912	7,2

A caracterização do aroma de quatro frutos (*Theobroma grandiflorum*, Spreng., *Spondias lutea* L., *Spondias purpurea*, L., *Anona reticulata*, L.) de origem brasileira, por SPME em headspace, foi proposta por Augusto et al. (2000). Os estudos de natureza apenas qualitativa foram realizados usando a polpa dos frutos dissolvida em 1 mL de solução saturada em NaCl, a extracção foi realizada com agitação, a 60°C e durante 30 minutos. Os autores avaliaram a eficiência de extracção das fibras de PDMS, PA, CW-DVB e CAR-PDMS. No que diz respeito aos aromas de natureza terpénica as fibras de PDMS, PA e CAR-PDMS apresentaram as melhores eficiências de extracção, a fibra CW-DVB demonstrou muito pouca afinidade para estes compostos, dos treze terpenos identificados nas polpas dos frutos apenas dois foram por ela extraídos.

Um dos primeiros estudos que propõe a utilização da técnica de SPME em headspace como alternativa para a determinação de óleos essenciais em plantas é o de Field et al., 1996. Os autores procuraram caracterizar e monitorizar a composição do óleo essencial de lúpulo, planta usada na indústria cervejeira e responsável pelo aroma e sabor da bebida. Uma das características deste óleo essencial é a presença de dois sesquiterpenos, humuleno e o cariofileno. As variedades de lúpulo usadas na produção da cerveja apresentam uma razão entre o teor de humuleno e de cariofileno (H/C) superior a 2,5. A monitorização e determinação desta razão H/C na planta recorre às técnicas tradicionais de destilação a vapor e extracção por solventes. Utilizando uma fibra de PDMS os autores, após optimização das condições de extracção (4 horas a 50°C), determinaram a constante

de distribuição dos compostos entre a fibra e o *headspace* da planta, de modo a proceder à sua quantificação. Os valores encontrados para a razão H/C revelaram-se concordantes com os obtidos pelos processos tradicionais, tendo a técnica SPME em *headspace* apresentado um desvio padrão relativo de 2,3%. A possibilidade de analisar pequenas amostras de planta (quantidades inferiores a 1 grama) a maior sensibilidade demonstrada e a ausência de solventes orgânicos, são as vantagens que contribuem para que SPME, de acordo com os autores, se apresente como uma boa alternativa na caracterização do óleo essencial de lúpulo.

A utilização da técnica SPME em *headspace* para determinar a composição monoterpénica dos óleos essenciais de duas espécies da planta de hortelã-pimenta foi proposta por Rohloff (1999, 2002). Particularmente importante no estudo era verificar o modo como variava a composição do óleo em função da maturação das folhas da planta. Os resultados observados, usando uma fibra de PDMS, demonstraram concordância com os obtidos por hidrodestilação. Do ponto de vista qualitativo, o número de compostos identificados pelas duas técnicas foi semelhante, mas SPME apresentou menor reprodutibilidade. SPME provou ser, em particular quando associada a um sistema cromatográfico com detector de massa, uma importante ferramenta na determinação qualitativa da composição dos óleos essenciais.

Um outro estudo, no qual se verifica a aplicabilidade de SPME na extracção de aromas voláteis em *headsapce* é o de Shang *et al.* (2002). Os autores utilizaram SPME em associação com GC-MS para identificação dos constituintes voláteis das flores de *Michelia alba*. A agradável e suave fragrância das flores potenciava o seu uso em perfumes, sendo por isso importante a identificação das substâncias responsáveis pelo aroma, o que foi conseguido por exposição de uma fibra de PDMS ao *headspace* de flores frescas numa simulação do seu ambiente natural.

Bicchi *et al.* (2000) estudaram a influência do revestimento das fibras na extracção dos compostos presentes no *headspace* de quatro plantas aromáticas e medicinais: rosmaninho, tomilho, salva e valeriana. Em vials de 12,5 mL de capacidade foram colocadas 0,6 g de folhas ou raízes secas moídas. As extracções foram realizadas a 60°C. De acordo com os autores, das oito fibras analisadas, as mais eficientes foram, por esta ordem, CAR-DVB-PDMS, PDMS, PDMS-DVB e CAR-PDMS. Quando comparada com a técnica convencional de *headspace* estático (S-HS), SPME em *headspace* (HS-SPME)

demonstrou ser superior para a análise das substâncias menos voláteis, conseguindo factores de concentração de algumas dezenas a centenas de vezes superiores aos obtidos por S-HS. Em contrapartida a extracção por S-HS, apresentou melhor desempenho para os compostos muito voláteis, algo já confirmado por outros estudos. Dos 22 terpenos identificados constavam α -pineno e α -terpineol. Das fibras testadas foi PDMS (100 μ m), fibra apolar, que demonstrou maior afinidade para o α -pineno, a extracção de α -terpineol apresentou maior eficiência para as fibras de características polares, CAR-PDMS, CAR-DVB-PDMS, PDMS-DVB e PA.

Do que foi até agora exposto, e em jeito de conclusão, é evidente que a técnica de SPME apresenta, pelas características que possui, um conjunto de vantagens que a permitem encarar como forte alternativa na extracção de voláteis. No que diz respeito à extracção de compostos de natureza terpénica, SPME apresenta maior sensibilidade do que outras técnicas comuns e uma substancial redução do tempo de análise, ao permitir realizar num único passo a extracção, concentração e quantificação.

É uma técnica que alia à simplicidade uma grande versatilidade, permitindo a extracção de voláteis presentes em matrizes distintas, como as de sumos, vinhos, frutos, óleos essenciais e até flores. A possibilidade de monitorização da libertação de voláteis, em sistemas *in vivo*, representa uma das mais interessantes aplicações desta técnica.

Não sendo uma técnica de extracção total, mas sim de equilíbrio, os resultados estão dependentes das condições experimentais e da matriz da própria amostra. Alterações nestas condições irão afectar a distribuição dos analitos entre as diversas fases, afectando a sensibilidade e a reprodutibilidade do método analítico. Na extracção de compostos terpénicos, e dada a volatilidade destes, o modo de amostragem em *headspace* revela-se adequado e até preferível em alguns casos.

Quanto ao revestimento da fibra, verifica-se que as fibras de natureza polar, não polar e mistas podem, mediante optimização das condições de extracção e dependendo das características dos compostos a extrair e da própria matriz, ser usadas na extracção de voláteis terpénicos. Fibras de natureza não polar (ex. PDMS) apresentam maior eficiência de extracção para os hidrocarbonetos terpénicos (ex. limoneno, α -pineno), compostos mais polares (como os álcoois terpénicos, ex. linalol, geraniol, etc.) são preferencialmente extraídos por fibras polares (ex. PA).

O tempo necessário para a extracção atingir o equilíbrio está dependente das volatilidades dos compostos e também da própria fibra. O aquecimento da amostra permite reduzir ao tempo necessário para se atingir o equilíbrio, mas está limitado quer pela natureza dos compostos quer pela fibra, que com o aumento da temperatura diminui a capacidade de extracção. De um modo geral as temperaturas usadas são relativamente baixas $\sim 40^{\circ}\text{C}$ e os tempos de extracção inferiores a 1 hora.

A alteração das características da matriz, através da adição de sal, é um procedimento comum. Deve no entanto ser avaliado, pois observa-se a ocorrência de diferentes comportamentos. Verifica-se que a extracção dos álcoois terpénicos é favorecida pelo aumento da força iónica da solução, enquanto os hidrocarbonetos terpénicos, como por exemplo o limoneno e α -pineno, apresentam menores eficiências de extracção.

3 A Esteva – *Cistus ladaniferus* L.

A esteva é uma planta pertencente à família das cistáceas (*Cistaceae*) e ao género *Cistus*. A distribuição deste género é relativamente vasta, compreendendo as ilhas Mediterrânicas, a Península Ibérica, o sul de França, a Itália, a Grécia, o Norte de África e as zonas litorais do Médio Oriente. Em Portugal encontram-se, distribuídas por todo o território, dez das dezasseis espécies puras que se admite fazerem parte do género *Cistus* (Amaral, 1971). A espécie mais comum é o *Cistus ladanifer* L. (esteva) presente em quase todo o território continental com excepção do noroeste e do centro-oeste, onde rareia. Apresenta-se na tabela 11 a classificação taxonómica da espécie *Cistus ladanifer* L. Desta espécie são conhecidas três variedades, encontrando-se em Portugal, apenas as duas primeiras (Amaral, 1971):

- *albiflorus* Dunnal
- *maculatus* Dunnal
- *sténophyllus* Grosser

Tabela 11. Classificação taxonómica da espécie *Cistus Ladanifer* L.

Taxonomia	
Phyllum	Espermatófito
Classe	Angiospérmica
Ordem	Violales
Família	Cistaceae
Género	<i>Cistus</i>
Espécie	<i>Cistus Ladanifer</i> L.
Nome vulgar	Esteva

A esteva é um arbusto cujo crescimento pode atingir a altura máxima de 2,5 m, floresce de Abril a Junho, possuindo flores com diâmetro entre 7 a 10 cm, constituídas por cinco pétalas imaculadamente brancas (var. *albiflorus* Dunnal) ou apresentando em cada uma das pétalas uma mancha de cor púrpura escura ao centro da flor (var. *maculatus* Dunnal), (Amaral, 1971; Quer, 1961).

As suas flores são muito atractivas para as abelhas. *Cistus ladanifer* L. é uma importante fornecedora de pólen, representando entre 69 a 92% do pólen usado pelas abelhas em diversas regiões do território continental (Campos *et al.*, 1998).

A esteva é, pelas características dos seus locais de ocorrência, um indicador biológico da degradabilidade dos solos. Considerada, uma espécie pouco exigente, suporta bem períodos de secura e desenvolve-se em terrenos pobres de natureza xistosa, graníticos ou siliciosos, distribuindo-se desde o nível do mar até altitudes superiores a 1000 metros. A sua elevada capacidade de resistência e tolerância em solos altamente contaminados com metais, foi recentemente observada num estudo desenvolvido nas proximidades das minas de Aljustrel (Alvarenga *et al.*, 1998).

É uma planta fortemente aromática que segrega uma oleorresina, designada por lábdano ou ládano, daí a denominação *ladanifer*, com bastante interesse comercial. A oleorresina distribui-se pelos vértices vegetativos e folhas mais jovens, desempenhando na planta duas funções específicas, protecção contra a dessecação e inibição do crescimento de espécies competidoras. Esta estratégia, denominada alelopatia, é o efeito directo ou indirecto de uma planta sobre outra através da libertação para o ambiente de compostos químicos com capacidade de provocarem efeitos fitotóxicos. A capacidade alelopática da oleorresina da esteva, em particular a redução e inibição da germinação de sementes e a inibição do desenvolvimento das raízes e cotilédones das espécies competidoras, têm vindo a ser observada em diversos estudos (Chaves *et al.*, 2001; Dias e Moreira, 2002). A capacidade fitotóxica da oleorresina tem sido atribuída à presença, na sua composição, de compostos fenólicos e flavonóides (Chaves *et al.*, 2001).

3.1 Produtos Obtidos a Partir da Esteva

A esteva e a oleorresina que produz são conhecidas e apreciadas desde a Antiguidade. A sua utilização em preparados medicinais e perfumes foi registada por autores gregos e romanos. A utilização da oleorresina em perfumaria esteve em moda nos sécs. XVIII e XIX. Foi após a introdução dos solventes voláteis que um conjunto de novos produtos, mais refinados, obtidos a partir da oleorresina bruta ou da planta inteira, permitiram diversificar e ampliar as suas aplicações.

As indústrias de perfumaria, cosmética e farmacêutica são os principais consumidores dos produtos derivados da esteva. Estes são particularmente apreciados pelo seu odor balsâmico, quente e duradouro, e semelhante a âmbar (Boelens, 1997; Moyler e Clery, 1997)

Na figura 5 apresentam-se os principais produtos obtidos a partir da esteva e respectivos processos (F. B., 1997). A região francesa de Grasse e a região da Andaluzia e de Zamora, na Espanha, são os principais produtores mundiais de derivados de esteva.

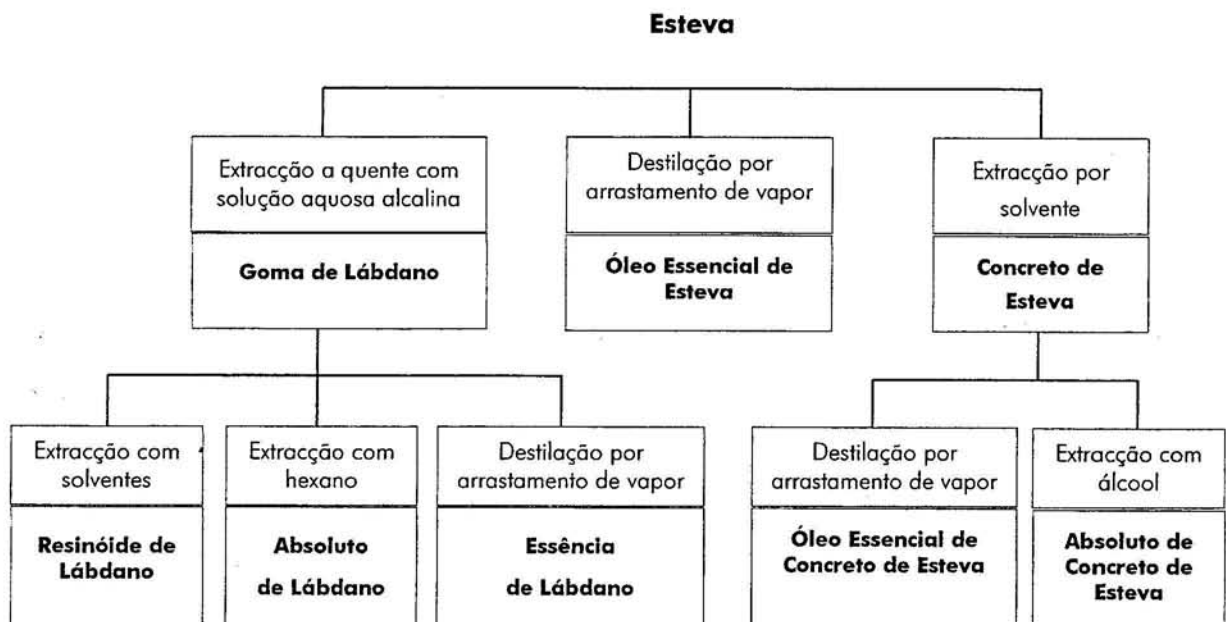


Figura 5. Principais produtos derivados da esteva.

Goma de lábdano é a designação atribuída à oleorresina exsudada pela esteva. É obtida por extracção de ramos e folhas da planta em água quente. A oleorresina funde-se, flutuando à superfície da água, é recolhida e prensada de modo a eliminar o excesso de água e segue para a secagem. A goma é posteriormente tratada permitindo obter dois dos principais produtos comerciais: o resinóide de lábdano (por extracção com solventes) e a essência de lábdano (por destilação).

O resinóide de lábdano é um produto muito viscoso, geralmente de cor escura, estando no entanto estas características dependentes do tipo de solvente usado. É considerado um excelente fixador, sendo frequentemente usado em sabões e detergentes (Moyler e Clery, 1997).

Também bastante apreciada pela indústria de perfumaria é a essência de lábdano ou óleo essencial de lábdano. Possuindo um odor quente e semelhante ao do âmbar, é considerado de qualidade superior, quando comparado com o seu congénere, o óleo essencial de esteva, sendo o seu uso limitado pelo elevado preço que atinge (Moyler e Clery, 1997). A partir da goma é ainda obtido um terceiro produto designado por absoluto de lábdano. Óleo quase incolor e solúvel em álcool, o absoluto de lábdano é de todos os extractos de esteva o mais barato.

Um segundo conjunto de produtos, conhecidos por “produtos *Cistus*”, são obtidos directamente a partir da planta e não da sua goma (Boelens, 1997). Por arrastamento de vapor de água a partir das folhas e ramos obtém-se o óleo essencial de esteva. Possui um odor balsâmico-herbáceo, muito característico, sendo por vezes rectificado para remoção dos terpenos que lhe conferem um odor acre.

A extracção da planta com solventes voláteis permite obter os concretos de esteva. O produto obtido possui uma consistência pastosa e cor que pode variar entre verde-escuro a castanho, dependendo quer do solvente usado quer da quantidade de clorofila extraída. O odor é considerado muito agradável, herbáceo, balsâmico e com notas de âmbar, possuindo boas propriedades fixativas. Muito utilizados em perfumaria são os absolutos de concreto de esteva, obtidos por extracção do concreto com álcool, possuindo também o característico odor balsâmico e notas de âmbar.

O interesse comercial na esteva tem estado preferencialmente direccionado para aproveitamento da oleorresina que exsuda. Apesar de ser, sem dúvida, este o aspecto mais importante, novas formas de utilização e valorização desta espécie tem vindo a ser recentemente estudadas.

Interessante é a possibilidade de aproveitamento dos resíduos botânicos resultantes da extracção da oleorresina para a produção de carvão e carvão activado. A composição química e estrutura do carvão obtido a partir dos resíduos da planta têm sido objecto de estudo (Pastor-Villegas, *et al.*, 1999, 2002).

O pólen da planta, para além da sua importância na apicultura, revelou possuir capacidade antioxidante (Nagai *et al.*, 2002). Num estudo recente, três extractos de pólen (fracção solúvel em água quente, fracção solúvel em água e fracção solúvel em etanol),

demonstraram elevada capacidade antioxidante e inibidora de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Propriedade importante na prevenção de várias doenças tais como o cancro, doenças cardiovasculares e diabetes.

Também comprovado têm vindo a ser o efeito inibidor, de diferentes extractos de *Cistus ladanifer* L., no desenvolvimento de fungos. O óleo essencial, o concreto e o absoluto de esteva e o resinóide de lábdano, todos de origem marroquina, foram avaliados, verificando-se uma maior eficácia na inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Mucor racemosus* e *Verticillium albo-atrum* por parte do óleo essencial. A capacidade de inibição evidenciada pelos diferentes extractos, com excepção do óleo essencial, estará segundo os autores associada à presença de compostos sesquiterpénicos de estrutura labdánica, enquanto que no óleo, os álcoois e os ésteres serão os responsáveis pelo efeito inibidor (Mrabet *et al.*, 1999).

3.2 Composição Química do Óleo Essencial de Esteva

A análise da composição química do óleo essencial de esteva tem sido objecto de alguns estudos. Em 1986, Simon-Fuentes *et al.*, analisaram um óleo comercial obtido por destilação a vapor de *Cistus ladanifer* L. (var. *maculatus* Dunnal). Os voláteis foram identificados por GC-MS na fracção neutra. Esta fracção foi obtida por pré-fraccionamento do óleo, dissolvido em éter etílico e sucessivamente extraído em solução aquosa saturada com bicarbonato de sódio, de modo a remover os ácidos livres, e com solução aquosa de hidróxido de sódio para remoção dos fenóis. O extracto etílico, contendo os compostos neutros, foi posteriormente lavado com uma solução saturada de cloreto de sódio, seco com sulfato de sódio anidro e o solvente removido por vácuo. A fracção neutra obtida foi ainda fraccionada em coluna de sílica gel separando-se os hidrocarbonetos dos compostos oxigenados. A complexidade da fracção dos compostos oxigenados não permitiu a sua análise directa, sendo necessário proceder a nova separação em coluna de sílica gel. Na tabela 12 encontram-se os principais constituintes identificados na fracção neutra do óleo. No total foram identificados 85 compostos.

Tabela 12. Principais constituintes da fracção neutra do óleo essencial de *Cistus ladanifer* L. (Simon-Fuentes *et al.*, 1986)

Compostos	Área – GC (%)	Compostos	Área – GC (%)
α -Pineno	35,0	2,2,6 - Trimetilciclohexanona	5,7
Canfeno	10,3	Linalol	0,5
Limoneno	2,3	Acetato de Bornilo	3,7
γ -Terpineno	1,6	Borneol	1,0
<i>p</i> -Cimeno	4,0	Vervenona	2,0

Ainda em 1986, Peyron e Alessandri, numa comparação das características dos óleos essenciais comerciais de *Cistus ladanifer* L., reuniram os resultados obtidos, em 1974 por Gülz e Königs, e em 1969 por Garcia-Martin e Garcia-Vallejo, para a composição volátil dos óleos. Reproduzem-se na tabela 13 alguns dos resultados.

Tabela 13. Resultados obtidos para a composição química de dois óleos essenciais de *Cistus ladanifer* L. (Peyron e Alessandri, 1986)

Compostos	Área – GC (%)	
	Gülz et Königs	Garcia-Martin et Garcia-Vallejo
α -Pineno	6,7 - 4,0 ^a	43,7 - 44,4 ^a
Canfeno	4,7 - 1,1	3,9 - 7,0
Limoneno	1,4 - 1,7	-
γ -Terpineno	1,3 - 0,2	-
<i>p</i> -Cimeno	0,7-1,6	6,3-4,5
2,2,6-Trimetilciclohexanona	1,7-4,8	-
Linalol	0,2-0,4	0,7-1,9
Acetato de Bornilo	4,8-3,2	4,9-8,2
Borneol	4,8 ^b	-
Acetato de geranilo	0,9-0,6	-
Geraniol	1,1-1,7	-
Eugenol	2,3-1,5	-

^a Os valores à esquerda foram obtidos para a planta colhida no Outono e à direita na Primavera

^b Valor obtido para a planta colhida na Primavera

Na comparação dos resultados obtidos sobressai a diferença na composição química do óleo. O monoterpene α -pineno aparece como principal constituinte do óleo nos resultados obtidos por Garcia-Martin e Garcia-Vallejo mas também no estudo, já referenciado, de Simon-Fuentes *et al.*, (ver tabela 12), mas a sua percentagem é significativamente inferior no óleo essencial avaliado por Gülz e Königs. A diferença observada para a composição química do óleo confirma a influência de parâmetros como sejam a origem botânica do material vegetal, a altura da colheita e o próprio método de isolamento nos resultados.

Mais recentemente (Mariotti *et al.*, 1997) identificaram como componentes principais do óleo de *Cistus ladanifer* L., cultivado na Córsega, o α -pineno (35%), viridiflorol (11,8%), ledol (3,3%) e acetato de bornilo (3,1%). O óleo essencial obtido por hidrodestilação foi fraccionado em coluna de sílica gel separando-se os hidrocarbonetos dos compostos oxigenados. Cada uma destas fracções foi ainda posteriormente fraccionada, tendo sido obtidas quatro fracções contendo os hidrocarbonetos e sete fracções constituídas pelos compostos oxigenados. A análise destas fracções por GC/FID e ^{13}C -RMN permitiu a identificação de 45 compostos, representando aproximadamente 83% da composição do óleo. Nos compostos identificados predominava a fracção monoterpénica, com 58,4%, enquanto os sesquiterpenos representavam aproximadamente 25%. Os resultados obtidos por Mariotti *et al.*, apresentam semelhanças com o de Simon-Fuentes *et al.*, (ver tabela 12), α -pineno e acetato de bornilo são em ambos os estudos compostos principais do óleo, no entanto os sesquiterpenos oxigenados ledol e viridiflorol não são referenciados no estudo de Simon-Fuentes *et al.* Os autores procuraram também neste estudo avaliar a variabilidade na composição química do óleo. Para o efeito analisaram 20 amostras de óleo essencial. Em 18 das 20 amostras avaliadas, α -pineno com uma percentagem compreendida entre os 11,7 e 47,4% foi o constituinte maioritário, seguido pelo *trans*-pinocarveol (4,4 - 10,9%) e o viridiflorol (4,7 - 10,7%). Em duas amostras foi encontrada uma diferente composição química, caracterizada pela predominância do viridiflorol (20,0 - 22,6%), ledol (6,4 a 6,7%) e *trans*-pinocarveol (5,4 - 8,6%).

Num estudo também recente, Freitas *et al.*, 1999, foram isolados os voláteis de folhas de *Cistus ladanifer* L. de origem Portuguesa. Folhas frescas da planta colhida na região do Douro foram imersas em 1 L água desionizada durante 24 horas. A solução aquosa foi filtrada e extraída com diclorometano (3 x 30 mL), à camada orgânica obtida foi

adicionado sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado por rotavapor até ao volume de 1 mL. A solução obtida foi analisada por GC-MS e GC-sniffing. Recorrendo a GC-preparativa foram isoladas seis fracções posteriormente avaliadas sensorialmente (GC-sniffing). Apresentam-se na tabela 14 os principais constituintes voláteis identificados no extracto de diclorometano.

Tabela 14. Principais constituintes observados no extracto de diclorometano de folhas de *Cistus ladanifer* L. (Freitas et al., 1999)

Compostos	Área – GC %	Compostos	Área – GC %
3-Careno	0,8	Borneol	7,7
α -Felandreno	3,5	Verbenona	2,3
2,2,6 - Trimetilciclohexanona	11,7	2-Feniletanol	11,5
Cânfora	3,5	Ledol	2,0
Acetofenona	29,0	Eugenol	2,7
cis-Verbenol	3,5	4-Hidroxi-3-Metilacetofenona	1,4

De acordo com os autores, o odor balsâmico, característico das folhas, parece estar associado à presença da 2,2,6 – trimetilciclohexanona, sendo este aliás, um dos principais constituintes a par da acetofenona e o 2-feniletanol. Particularmente interessante neste estudo é o facto do monoterpene α -pineno que é nos estudos anteriores referenciado como principal componente não constar entre os principais constituintes detectados neste óleo.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado, constituído por amostras de *Cistus ladanifer* L., foi colhido, aleatoriamente, no campo, região de Trás-Os-Montes e Alto Douro, localidade de Mirandela, em Julho de 2002. Foram recolhidos a partir da planta os ramos superiores de modo a incluir na amostra as extremidades vegetativas e as folhas mais jovens. As plantas depois de colhidas foram depositadas, por um breve período, no laboratório em local ventilado e protegido da acção directa da luz.

4.1.2 Padrões e Reagentes

Para o estudo da composição química do óleo essencial foram seleccionados e adquiridos os seguintes padrões individuais:

- α -Pineno, Fluka, grau de pureza 99,0%
- 2,2,6 – Trimetilciclohexanona, Fluka, grau de pureza 99,0%
- Linalol – Sigma, grau de pureza 99,0%
- Borneol, Fluka, grau de pureza 99,0%
- α -Terpineol, Fluka, grau de pureza 99,0%
- Citronelol, Sigma, grau de pureza 99,0%
- Geraniol, Sigma, grau de pureza 99,0%
- Eugenol, Sigma, grau de pureza 99,0%
- Acetato de bornilo, Fluka, grau de pureza 99,0%
- Acetato de geranilo, Fluka, grau de pureza 99,0%

Outros reagentes adquiridos:

- Etanol, LiChrosolv *gradiente grade*, Merck
- Pentano, *p.a. grade*, Riedel-de Hën
- Hexano, *p.a. grade*, Panreac
- Ciclohexano, *p.a. grade*, Panreac

- Éter Dietílico, *p.a. grade*, Merck
- Água extra pura, LiChrosolv, Merck
- Sulfato de magnésio anidro, *p.a. grade*, Panreac
- Cloreto de sódio, *p.a. grade*, Panreac

4.1.3 Equipamento

Apresenta-se nesta secção uma listagem do principal equipamento usado.

- Cromatógrafo gasoso Finnigan 9000, equipado com um detector de ionização de chama (FID) e com uma coluna capilar Varian CP-Sil 5CB – (30 m comprimento × 0,53 mm diâmetro interno × 1,5 µm filme).
- Fibra de polidimetilsiloxano, PDMS, 100 µm, Supelco.
- Fibra de poliacrilato, PA, 85 µm, Supelco.
- Placa de aquecimento/agitação Corning
- Aparelho de extracção – SDE

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos Padrões analíticos

Na preparação das soluções de padrões individuais pesaram-se rigorosamente, numa balança electrónica de alta precisão, Mettler Toledo AG 245, ~125 mg de cada um dos padrões individuais, para balões volumétricos de 50 mL. Etanol foi o solvente usado na preparação de todos os padrões. As quantidades pesadas de cada um dos padrões, assim como, as concentrações dos padrões preparados encontram-se no anexo A, secção A1.

As misturas padrão utilizadas foram preparadas a partir das soluções de padrões individuais, por diluição em etanol, para balões volumétricos de 50 mL e 25 mL.

As medições de todos os padrões foram realizadas através de micro-pipetas de 20-100 µg/L (Merck Transferpette), 0,1-1 mL (Socorex Calibra 822) e 1-5 mL (Treff-Lab). As soluções padrão foram guardadas em frascos de âmbar de 40 e 15 mL no frigorífico a 4°C.

4.2.2 Extracção do óleo essencial

Para extracção do óleo essencial de esteva foi utilizada a técnica de destilação e extracção simultânea, SDE. O aparelho utilizado está representado na figura 6, na página seguinte.

Procedimento geral de extracção:

- Num balão de 500 mL de fundo redondo (fase aquosa) foi introduzida uma quantidade conhecida de amostra a extrair juntamente com 300 mL de água destilada.
- Num balão de 100 mL de fundo redondo (fase orgânica), foram introduzidos 50 mL de solvente orgânico.
- A zona de separação das fases orgânica e aquosa, em U, do aparelho SDE foi cheia, primeiro com água destilada até à marca de referência e depois com solvente até começar a verter líquido em cada um dos dois braços do aparelho de SDE.
- O condensador foi ligado a um refrigerador de água – Grant LT D6G –, mantido a 5°C. Os braços do condensador foram isolados.
- Os balões contendo as duas fases foram aquecidos por mantas de aquecimento. A temperatura da fase aquosa foi mantida a ~120°C, o solvente foi mantido a uma

temperatura de $\sim 20^{\circ}\text{C}$ acima da sua temperatura de ebulição à pressão atmosférica. No fim da extracção desligou-se a manta de aquecimento da fase aquosa, mantendo-se em refluxo a fase orgânica por mais 15 minutos. Após o arrefecimento do sistema, a fase orgânica presente na zona de separação de fases foi transferida para o respectivo balão.

- À fase orgânica obtida foi adicionado de sulfato de magnésio anidro de modo a garantir a ausência de água no extracto final. Procedeu-se à filtração sob vácuo da fase orgânica usando um funil de placa porosa. O solvente foi removido por evaporação no rotavapor – Büchi Rotavapor R-114. O extracto obtido foi depois diluído em etanol para balão volumétrico de 5 ou 10 mL.

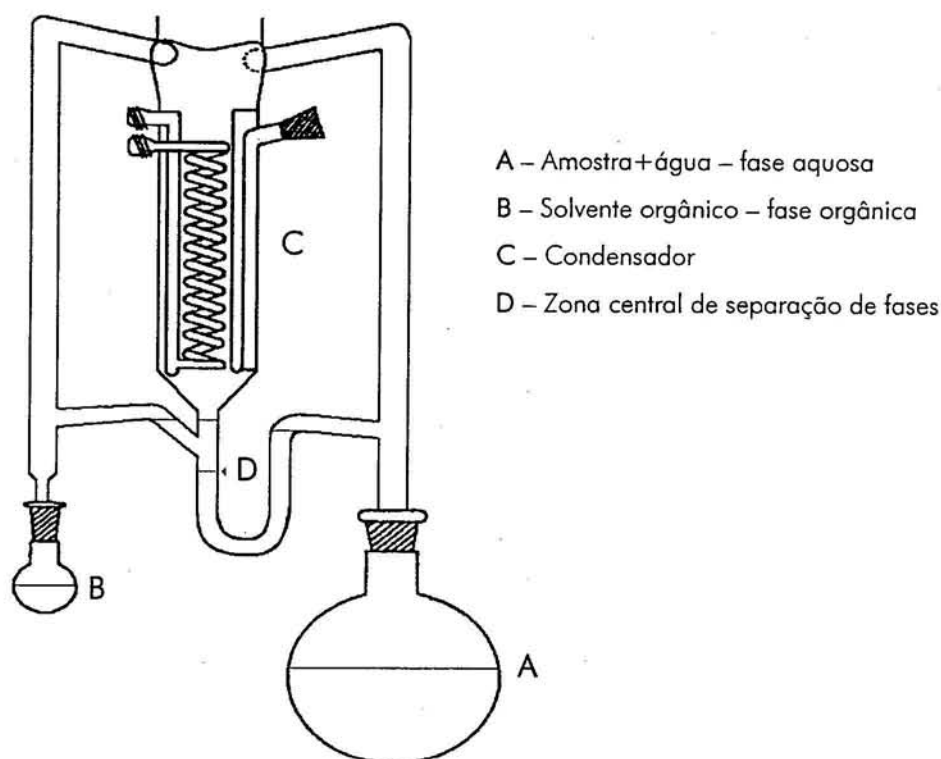


Figura 6. Esquema do aparelho de SDE. (Adaptado de Seidel e Lindner, 1993)

A eficiência de extracção do processo de SDE foi avaliada de acordo com o procedimento geral de extracção descrito acima. Como amostra foi utilizada uma quantidade exacta de mistura padrão. Foi avaliada a influência dos parâmetros solvente e tempo de extracção na eficiência do processo extractivo. Inicialmente determinaram-se as eficiências de extracção para os solventes pentano, hexano, ciclohexano, éter diétilico e para uma mistura em partes iguais de pentano e éter diétilico. Com o solvente escolhido efectuaram-se posteriormente ensaios para optimização do tempo de extracção. Foi ainda estudada a

recuperação do processo extractivo pelo método de adição padrão. Os resultados destes estudos encontram-se reunidos na secção 5.4.

Utilizando os parâmetros de extracção optimizados procedeu-se à extracção do material vegetal (~15 g de folhas) de acordo com o procedimento geral já descrito. Os extractos obtidos foram posteriormente analisados por SPME/GC-FID, para determinação e quantificação dos compostos em estudo (secção 5.5).

4.2.3 Análise do óleo essencial

Para a análise do óleo essencial, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Finnigan 9000, equipado com um detector de ionização de chama (FID) e com uma coluna capilar Varian CP-Sil 5CB – (30 m comprimento × 0.53 mm diâmetro interno × 1,5 µm filme).

A análise dos extractos obtidos por SDE foi precedida de uma etapa de extracção usando SPME. Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões, obtidos para as mesmas condições analíticas.

Condições analíticas utilizadas na análise por injeção directa dos padrões:

- Temperatura do forno programada a 50°C durante 5 minutos, rampa de 2°C/minuto até aos 150°C, mantendo esta temperatura durante 1 minuto seguida de uma segunda rampa de 15°C/minuto até aos 280°C, mantendo-se a esta temperatura durante 15 minutos.

- Temperatura do injector 260°C
- Temperatura do detector 300°C
- Gás de arraste hélio 6.0 (99,9999%), caudal de 5 mL/min
- Gás de make-up hélio 6.0 (99,9999%), caudal de 20 mL/min
- Hidrogénio 5.0 (99,999%), caudal 18 mL/min
- Ar puro, caudal 175 mL/min
- Injeção em modo splitless

Condições analíticas utilizadas na análise por SPME/GC-FID dos padrões e dos extractos de esteva:

- Temperatura do forno programada a 70°C durante 1 minuto, rampa de 2°C/minuto até aos 150°C, mantendo esta temperatura durante 1 minuto seguida de uma segunda rampa de 15°C/minuto até aos 280°C, mantendo-se a esta temperatura durante 15 minutos.
- Temperatura do injecto 260°C
- Temperatura do detector 300°C
- Gás de arraste hélio 6.0 (99,9999%), caudal de 5 mL/min
- Gás de make-up hélio 6.0 (99,9999%), caudal de 20 mL/min
- Hidrogénio 5.0 (99,999%), caudal 18 mL/min
- Ar puro, caudal 175 mL/min
- Injecção em modo splitless

Para optimização das condições de operação procedeu-se à injeção directa de padrões individuais e de misturas e padrões. Na injeção directa dos padrões foi usada uma micro-seringa, com um volume de injeção de 1 µL – SGE 1BR-7.

Após a optimização da separação cromatográfica, realizaram-se injeções, de misturas padrão, para obtenção de curvas de calibração com a determinação do respectivo limite de detecção, intervalos de confiança e avaliação da precisão. Os resultados obtidos para a análise dos padrões por injeção directa encontram-se na secção 5.1.

Procedeu-se posteriormente aos ensaios envolvendo a microextração em fase sólida (SPME) em headspace. As fibras utilizadas (PDMS e PA) foram inicialmente condicionadas no injecto do cromatógrafo, de acordo com as indicações do fabricante. Para as extrações, a fibra foi colocada num suporte apropriado (Supelco). Foram usados vials de âmbar de 4 mL (Supelco) preenchidos até metade da sua capacidade com 2 mL de amostra. Os vials foram mergulhados num banho aquecido numa placa de aquecimento/agitação Corning. A temperatura do banho foi controlada com um termómetro. Após a extração, a fibra foi imediatamente inserida no injecto do GC, aí permanecendo durante um período de 5 minutos. O tempo de exposição da fibra no injecto foi avaliado de modo a garantir a dessorção completa dos analitos. Na análise

das amostras foram sempre efectuadas corridas em branco, sem extracção, de modo a verificar a ocorrência *carryover*, isto é, dessorção incompleta dos compostos da fibra com o seu consequente arrastamento para a análise seguinte.

Na optimização das condições de extracção usando SPME foram estudados os seguintes parâmetros:

- tipo de fibra, PDMS (apolar) e PA (polar)
- temperatura de extracção
- tempo de extracção
- influência da adição de sal à amostra.

Os resultados referentes a este estudo estão descritos na secção 5.2.

Com os parâmetros de extracção óptimos, efectuaram-se ensaios de extracção que permitiram a obtenção de curvas de calibração e a validação do método analítico proposto. Procedeu-se à avaliação dos parâmetros de:

- Linearidade, com a determinação dos respectivos limites de detecção e intervalos de confiança.
- Precisão através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia.
- Exactidão, através de ensaios de recuperação pelo método de adição padrão.

Apresentam-se na secção 5.3 os principais resultados obtidos para validação do método analítico.

5 Resultados e Discussão

Numa primeira fase deste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento e validação das condições cromatográficas que permitiram a separação adequada dos compostos em estudo. Os resultados obtidos para, esta primeira fase do trabalho, estão reunidos no subcapítulo 5.1 (Análise Cromatográfica dos Padrões por Injecção Directa).

Seguidamente optimizaram-se as condições operatórias de extracção por SPME, as quais associadas às condições definidas anteriormente permitiram a validação do método analítico (subcapítulos - 5.2 Desenvolvimento do Método de Extracção por SPME e 5.3 Validação do Método de Análise por SPME/GC-FID).

Finalmente foram estudadas as condições experimentais que permitiram a obtenção de extractos de Esteva por SDE (subcapítulo - 5.4 Obtenção de extractos de Esteva por Destilação – Extracção Simultânea), tendo-se procedido à análise por SPME/GC-FID das amostras isoladas (subcapítulo - 5.5 Análise dos Extractos de Esteva isolados por SDE).

5.1 Análise Cromatográfica dos Padrões por Injecção Directa

Para determinação da ordem de eluição (tempo de retenção) dos compostos e optimização da separação cromatográfica, realizaram-se injecções directas de padrões individuais e de misturas padrão. Apresenta-se na figura 7, um cromatograma obtido para as condições de operação optimizadas para o modo de injecção directa.

Os resultados obtidos permitiram observar a seguinte ordem de eluição para a coluna escolhida: α -pineno, 2,2,6-trimetilciclohexanona, linalol, borneol, α -terpineol, citronelol, geraniol, acetato de bornilo, eugenol, acetato de geraniol.

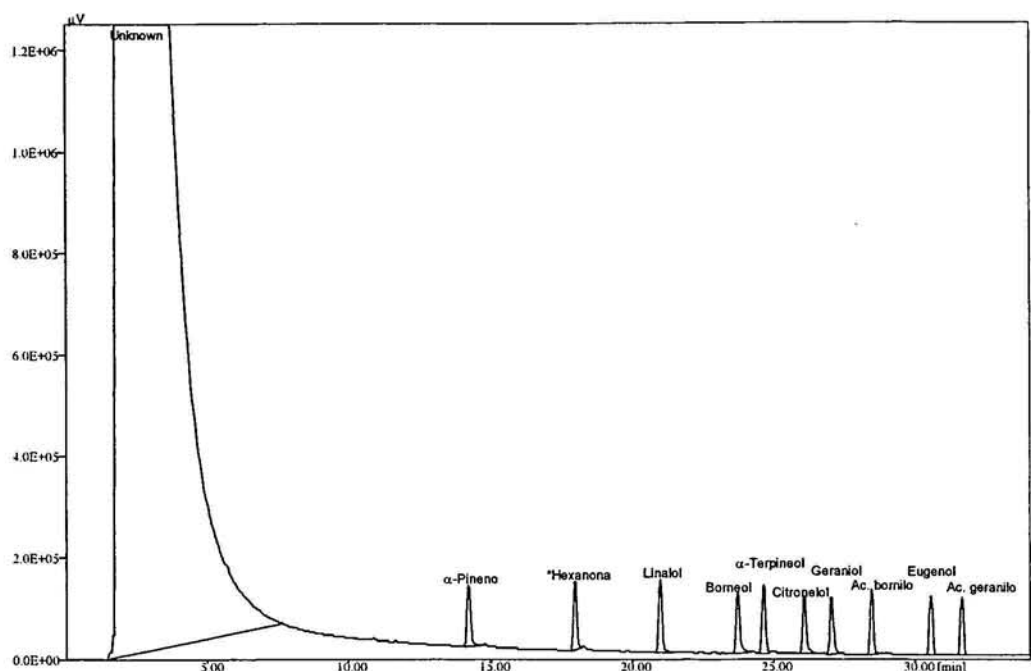


Figura 7. Cromatograma obtido para uma mistura padrão contendo os compostos em estudo com uma concentração individual de ~100 mg/L. (* 2,2,6-Trimetilciclohexanona)

Após os ensaios preliminares de optimização da separação cromatográfica, procedeu-se ao estudo da linearidade de resposta do detector. Foram injectadas, em triplicado, misturas padrão a 5 níveis para uma gama de concentrações compreendida entre 10 e 100 mg/L. Os resultados permitiram estabelecer curvas de calibração para todos os compostos em estudo, que se apresentam nas duas figuras seguintes.

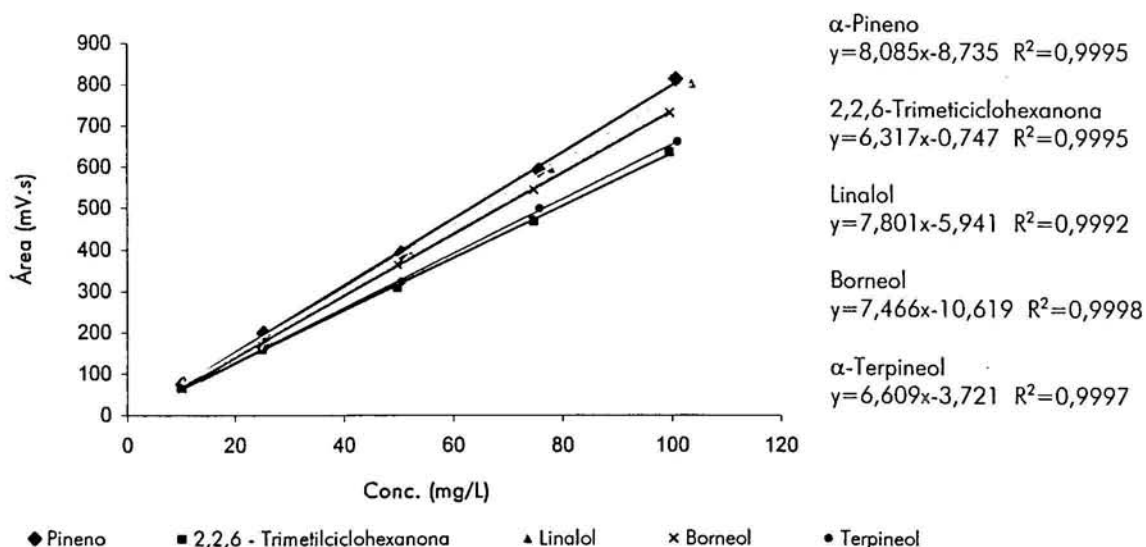


Figura 8. Curvas de calibração de α -pineno, 2,2,6-trimetilciclohexanona, linalol, borneol, α -terpineol, para injeção directa.

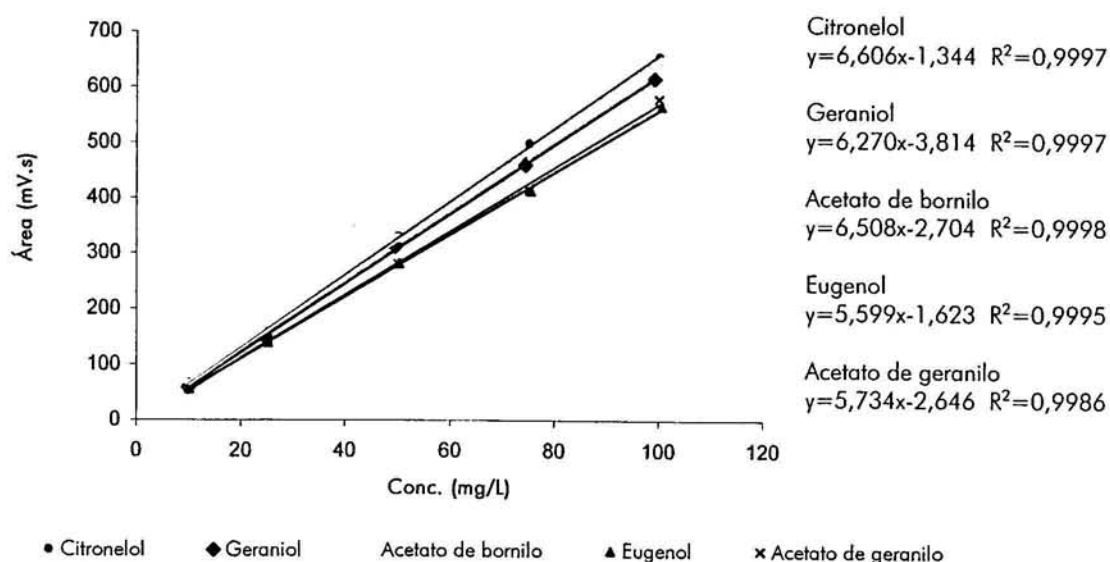


Figura 9. Curvas de calibração de citronelol, geraniol, acetato de bornilo, eugenol, acetato de geraniol, para injeção directa.

Para o estudo da linearidade foram determinados alguns parâmetros estatísticos (Miller e Miller, 2000), tendo sido remetido para anexo (ver Anexo A, secções A2 e A3) a descrição do tratamento estatístico efectuado bem como todos os cálculos afectos. Na tabela 15 apresentam-se alguns dos principais resultados desse estudo. Os limites de detecção apresentados (LD) são meramente informativos das capacidades da técnica.

Tabela 15. Resultados do estudo de linearidade da análise cromatográfica dos padrões por injeção directa.

Composto	Regressão linear (95%)		R^2	LD (mg/L)
	Ordenada	Declive		
α -Pino	$-8,735 \pm 21,322$	$8,085 \pm 0,344$	0,9995	2,5
2,2,6-Trimetilciclohexanona	$-0,747 \pm 15,527$	$6,317 \pm 0,252$	0,9995	2,3
Linalol	$-5,941 \pm 25,514$	$7,801 \pm 0,401$	0,9992	3,1
Borneol	$-10,619 \pm 12,023$	$7,466 \pm 0,196$	0,9998	1,5
α -Terpineol	$-3,721 \pm 11,897$	$6,609 \pm 0,192$	0,9997	1,7
Citronelol	$-1,344 \pm 12,994$	$6,606 \pm 0,211$	0,9997	1,9
Geraniol	$-3,814 \pm 11,750$	$6,270 \pm 0,193$	0,9997	1,8
Acetato de bornilo	$-2,704 \pm 10,578$	$6,508 \pm 0,172$	0,9998	1,5
Eugenol	$-1,623 \pm 13,054$	$5,599 \pm 0,211$	0,9995	2,2
Acetato de geraniol	$-2,646 \pm 23,610$	$5,734 \pm 0,384$	0,9986	3,9

R^2 – coeficiente de correlação quadrático; LD – limite de detecção

A validação dos resultados de uma curva de calibração pressupõem que sejam satisfeitas as seguintes condições:

$$\frac{s_b}{b} \leq 5\%$$

$$a - ts_a < 0 < a + ts_a \quad (t \text{ para um nível de confiança de } 95 \%)$$

em que a representa a ordenada na origem, b o declive e s_a e s_b os desvios padrão respectivos. Na tabela 2 reúnem-se estes resultados, encontrando-se em anexo os cálculos efectuados (ver Anexo A, secção A3).

Os resultados obtidos são bastante satisfatórios uma vez que as condições de linearidade são cumpridas. Verifica-se, para todos os compostos sem excepção, que o erro do declive é inferior a 5% e o intervalo de confiança para a ordenada na origem inclui a própria origem.

Tabela 16. Condições de linearidade para análise cromatográfica dos padrões por injeção directa.

Composto	Parâmetros		
	$\frac{s_b}{b}$ (%)	$a - ts_a$	$a + ts_a$
α -Pineno	1,34	-30,06	12,59
2,2,6-Trimetilciclohexanona	1,26	-16,27	14,78
Linalol	1,62	-31,46	19,57
Borneol	0,83	-22,64	1,40
α -Terpineol	0,91	-15,62	8,18
Citronelol	1,01	-14,34	11,65
Geraniol	0,97	-15,56	7,94
Acetato de bornilo	0,83	-13,28	7,87
Eugenol	1,19	-14,68	11,43
Acetato de geranilo	2,11	-26,26	20,96

Foram ainda realizados alguns ensaios para avaliação da precisão. Os resultados obtidos quanto à repetibilidade e precisão intermédia estão reunidos na tabela 17. Estes estudos foram realizados para o nível de concentração intermédio (~50 mg/L). A repetibilidade do método, expressa pelo coeficiente de variação, foi avaliada para de seis determinações

independentes da mesma solução padrão, realizadas nas mesmas condições de operação e durante o mesmo dia.

Para o estudo da precisão intermédia foram efectuadas injeções directas da mesma solução padrão em dias diferentes, sendo os resultados obtidos igualmente apresentados sob a forma do coeficiente de variação.

Encontram-se em anexo os todos resultados obtidos para avaliação destes parâmetros (ver Anexo A, secção A4, tabelas A17 a A22).

Tabela 17. Resultados para a precisão da análise cromatográfica dos padrões por injeção directa.

Composto	Precisão	
	Repetibilidade	Precisão Intermédia
	CV (%) (n=6)	CV (%) (n=12)
α -Pirino	3,0	3,9
2,2,6-Trimetilciclohexanona	3,7	4,4
Linalol	3,3	3,6
Borneol	4,3	4,9
α -Terpineol	5,0	4,1
Citronelol	2,1	4,2
Geraniol	3,2	4,6
Acetato de bornilo	4,5	5,3
Eugenol	3,8	4,7
Acetato de geraniolo	2,7	6,7

n – número de injeções; CV – coeficiente de variação (razão entre o desvio padrão e o valor médio das áreas obtidas, expresso em %)

Da observação dos resultados conclui-se que a resposta do detector FID utilizado não apresentou variações de resposta significativas. Foram obtidos para todos os compostos resultados de repetibilidade e de precisão intermédia com coeficientes de variação inferiores a 10%. Os resultados obtidos para a precisão intermédia foram ligeiramente superiores aos obtidos para a repetibilidade.

5.2 Desenvolvimento do Método de Extração por SPME

Para a quantificação dos compostos em estudo, nos extractos de Esteva, usou-se a técnica de microextração em fase sólida em associação com o sistema analítico GC-FID. Esta é uma técnica que permite em um único passo extrair, concentrar e introduzir a amostra para análise instrumental, tudo isto aliado a uma grande simplicidade de manuseamento.

Procurou-se neste trabalho beneficiar particularmente da selectividade que SPME possui. Este é um factor importante uma vez que é impraticável a introdução de todos os compostos presentes em uma amostra num instrumento analítico. Um certo grau de selectividade é sempre desejável, sendo muitas vezes essencial a remoção de compostos interferentes ou a simplificação de matrizes muito complexas, de modo a que os resultados possam ser correctamente interpretados. A escolha de uma fibra específica, isto é de um determinado revestimento, deverá ter em conta a selectividade desejada ou seja a polaridade, volatilidade e tamanho dos analitos a extrair. Não menos importante é a definição das condições de extração, uma vez que SPME é bastante sensível às condições experimentais.

A optimização de factores com influencia no processo extractivo como: tipo de fibra, temperatura de extração, efeito iónico e tempo/cinética de extração foi avaliada, apresentando-se neste capítulo os resultados obtidos.

Optou-se pelo modo de extração em *headspace* (HS-SPME), uma vez que os compostos a analisar são voláteis esperando-se portanto tempos de equilíbrio inferiores aos que poderiam ser observados por imersão da fibra. A extração em *headspace* pode ainda permitir a redução de eventuais efeitos de matriz e outros interferentes presentes na amostra. A possibilidade de manipulação das características da matriz, como seja a adição de sal, sem danificar a fibra, foi ainda outro factor que determinou a escolha deste modo de extração.

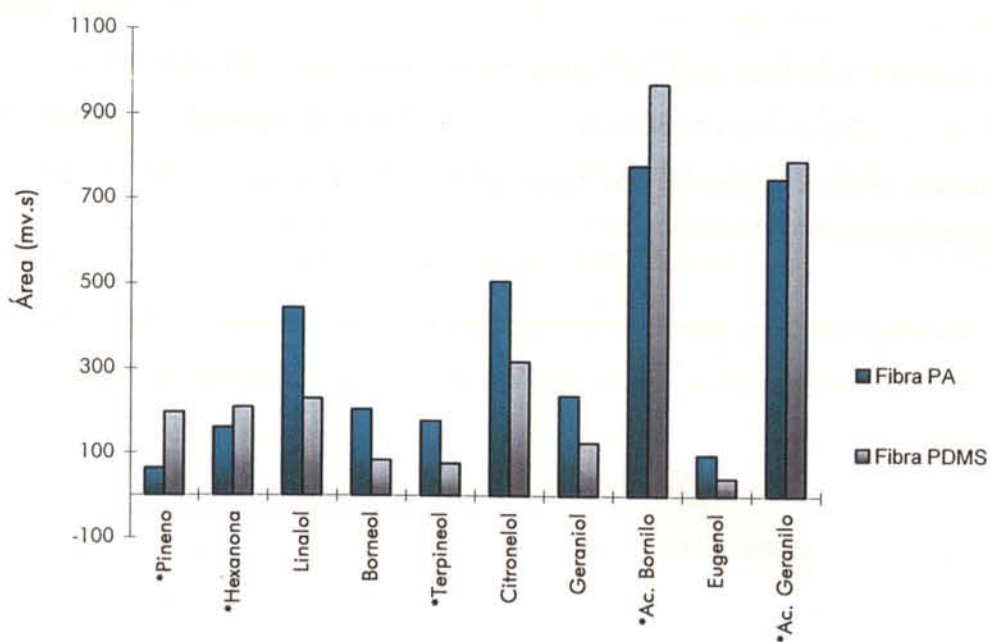
O tempo de dessorção da fibra no injector foi também avaliado. Verificou-se que o tempo 5 minutos para uma temperatura do injector de 260°C era suficiente para garantir a dessorção dos analitos. A possibilidade de ocorrência de "carryover" foi periodicamente avaliada através da realização de ensaios a branco. Todos os ensaios foram realizados

com agitação contínua e constante. Para o estudo das condições óptimas de extracção usaram-se soluções aquosas (1% v/v em etanol) com os compostos em estudo em concentrações de $\sim 100 \mu\text{g/L}$. Apresentam-se nos capítulos seguintes os principais resultados, encontrando-se no anexo B, secção B2 todos os resultados obtidos.

5.2.1 Selecção do tipo de fibra

Para este estudo foram seleccionadas duas fibras de SPME diferindo no revestimento da fase absorvente, PDMS (100 μm polidimetilsiloxano) e PA (85 μm poliacrilato). Ambas as fibras têm sido usadas na extracção de voláteis de natureza terpénica.

Os resultados do estudo comparativo das fibras encontram-se representados na figura seguinte. Os ensaios foram realizados a 40°C , o teor de sal (NaCl) na amostra foi de 20% (m/v) e o tempo de extracção foi de 60 minutos.



* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol; acetato de bornilo, acetato de geraniol

Figura 10. Estudo da influência do tipo de fibra na eficiência de extracção em solução aquosa por HS-SPME. (Tempo de extracção de 60 minutos, temperatura de extracção de 40°C , teor em sal (NaCl) de 20% (m/v))

A fibra de PDMS é não polar, bastante eficaz na extracção de analitos não polares. Pode no entanto ser usada com eficácia na extracção de compostos polares mediante

optimização das condições de extracção. A fibra de poliacrilato (PA) apresenta características polares. Um outro conjunto de fibras ditas mistas (fibras constituídas por PDMS, DVB e/ou Car) tem sido também referenciado na extracção de voláteis de natureza terpénica. Não foram no entanto consideradas neste estudo pelo facto de apresentarem menor intervalo de linearidade, saturando com facilidade e verificando-se ainda competição entre os analitos.

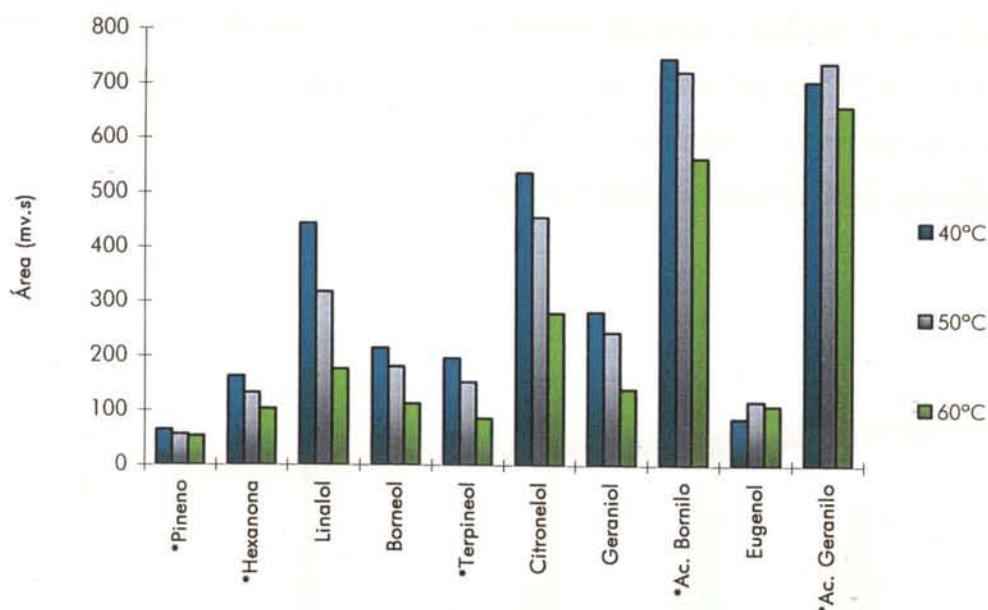
Da análise da figura 10 verifica-se que a fibra de PA é mais eficiente na extracção dos compostos de maior interesse neste estudo. Os álcoois monoterpénicos, linalol, α -terpineol, borneol, citrionelol, geraniol e o fenilpropanóide eugenol, apresentam para esta fibra valores de extracção significativamente superiores aos observados para a fibra de PDMS. A eficiência de extracção da fibra de PA (avaliada em função das áreas registadas) foi, para estes compostos, 1,5 a 2,4 vezes superior à obtida com a fibra de PDMS. Estes resultados vão ao encontro de outros obtidos em estudos já referenciados (Steffen e Pawliszyn, 1996; Penton, 1997).

Ambas as fibras apresentam grande afinidade para os acetatos de bornilo e geranilo, sendo os resultados da fibra de PDMS ligeiramente superiores. Esta fibra apresenta ainda maior afinidade para o monoterpeneo α -pineno, resultado já esperado e confirmado em outros estudos, dada a natureza não polar deste composto, bem como para a 2,2,6-trimetilciclohexanona.

A maior afinidade para os álcoois monoterpénicos e para o eugenol demonstrada pela fibra de PA foi decisiva para a sua escolha e utilização nos estudos posteriores de optimização.

5.2.2 Efeito da temperatura de extração

Para determinação da temperatura de extração ótima foram executados ensaios a três níveis de temperatura, 40°C, 50°C e 60°C. As restantes condições de extração mantiveram-se. A fibra de poliácrlato esteve exposta durante 60 minutos e o teor de sal (NaCl) na amostra foi de 20% (m/v). Apresentam-se na figura 11 os resultados obtidos.



* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol; acetato de bornilo, acetato de geraniol

Figura 11. Estudo da influência da temperatura na eficiência de extração em solução aquosa por HS-SPME. (Tempo de extração de 60 minutos, teor em sal (NaCl) de 20% (m/v))

Analisando os resultados verifica-se que a extração à temperatura de 40°C permite obter para a grande maioria dos compostos em estudo superiores eficiências de extração. As únicas exceções são o eugenol e o acetato de geraniol para os quais a temperatura ótima de extração é de 50°C. Para todos os outros compostos o aumento da temperatura traduziu-se numa diminuição da quantidade extraída.

Uma avaliação da eficiência de extração global, permite observar que a quantidade extraída total (avaliada em função da área total) diminuiu sucessivamente com o aumento a temperatura. A 40°C a área total foi de 3438,34 mV.s, 3117,34 mV.s foi o valor obtido a 50°C e 2284,42 mV.s para a temperatura de 60°C. Conclusões semelhantes encontram-se em estudos similares como o de Zhang *et al.*, 1998.

O aumento da temperatura de extracção tem associado dois efeitos contrários. Se por um lado permite libertar mais analitos da matriz para o *headspace*, resultando numa maior concentração destes no *headspace*, aumentando deste modo a eficiência de extracção, verifica-se pelo outro uma diminuição de K_{ts} , constante de distribuição fibra/amostra (Pawliszyn, 1997; Lord e Pawliszyn, 2000).

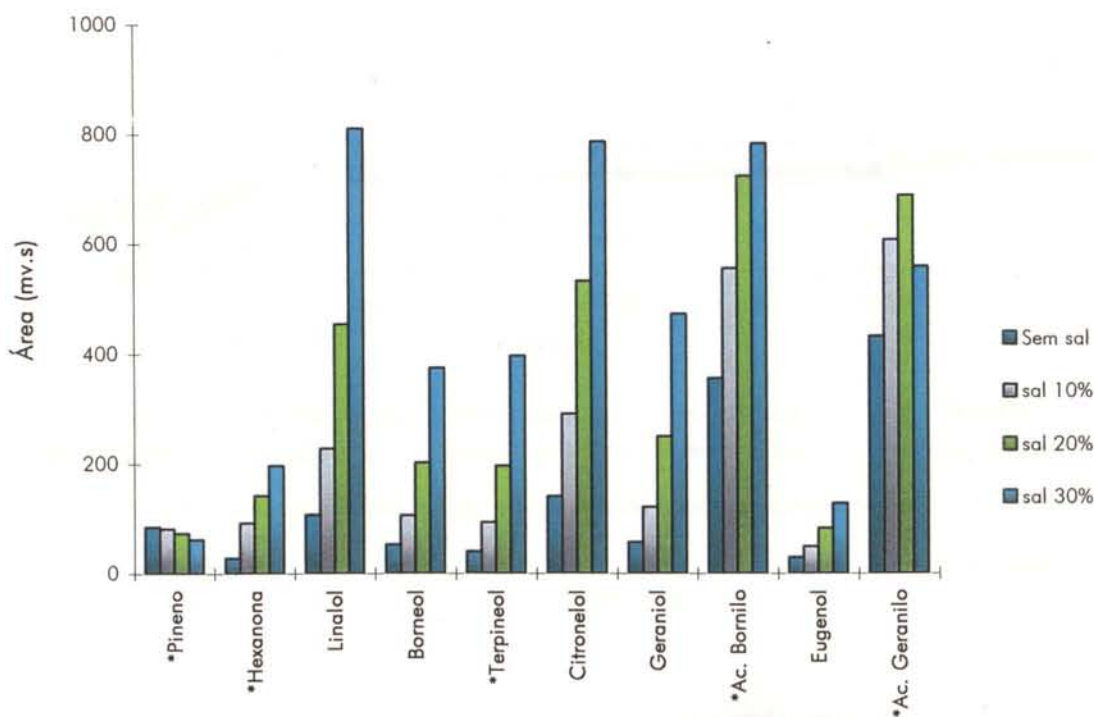
O efeito global do aumento da temperatura de extracção foi de uma diminuição da sensibilidade, as quantidades extraídas foram menores. De acordo com os resultados a temperatura de 40°C foi escolhida, tendo sido utilizada nos ensaios posteriores. Esta é ainda uma temperatura moderada sendo menos provável a ocorrência de eventuais degradações dos analitos termicamente mais sensíveis.

5.2.3 Efeito da força iónica

A adição de sal a amostras aquosas é um procedimento comum e que permite reduzir a solubilidade dos compostos, aumentando a quantidade de analitos no headspace e consequentemente na fibra.

Para avaliação do efeito da adição sal (NaCl) na eficiência de extracção foram realizadas extracções com diferentes teores em sal 0, 10, 20, 30% (m/v).

Uma vez mais se mantiveram constantes os restantes parâmetros: tempo de extracção de 60 minutos temperatura de extracção de 40°C. Os resultados obtidos estão representados na figura 12.



* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol; acetato de bornilo, acetato de geraniolo

Figura 12. Estudo do efeito do aumento da força iónica na eficiência de extracção em solução aquosa por HS-SPME. (Tempo de extracção de 60 minutos, temperatura de extracção de 40°C)

Com excepção do α -pineno e do acetato de geraniolo, para os restantes compostos observam-se aumentos muito significativos na eficiência de extracção com o aumento do teor em sal. Um teor em sal de 20% (m/v) teve como efeito um aumento de quase 5 vezes (4,9) na quantidade extraída de α -terpineol, um aumento de 3,8 vezes foi observado para

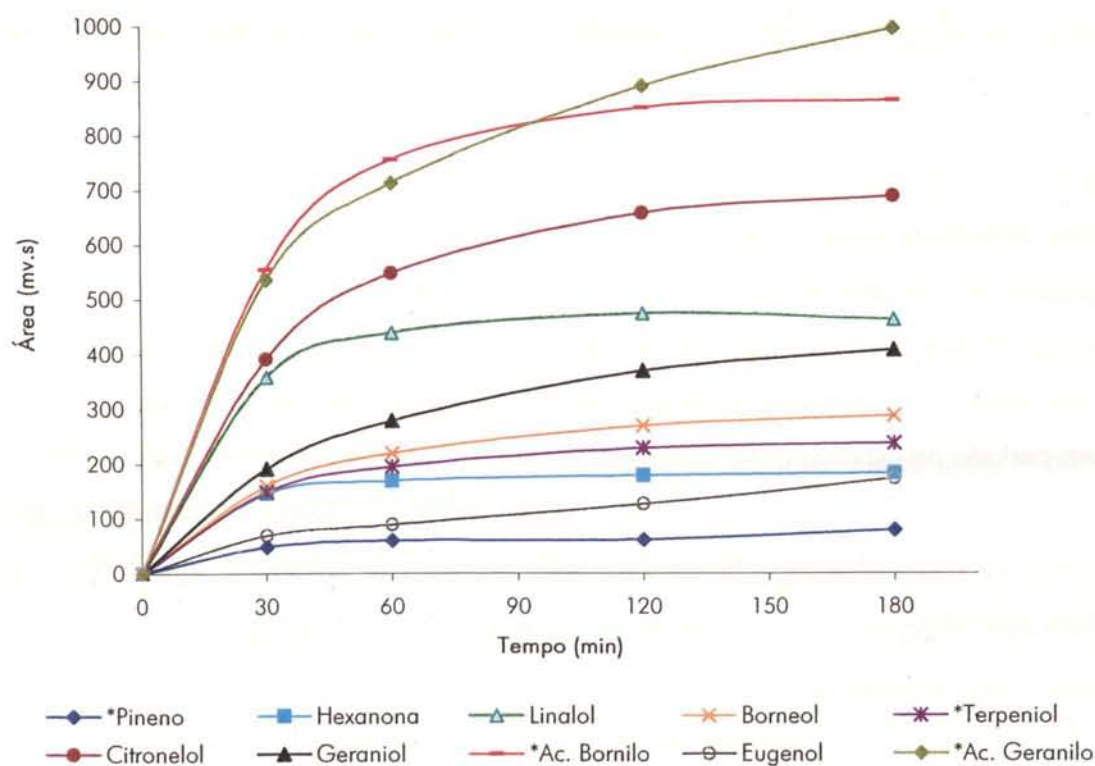
o borneol e citrônolol, linalol e geraniol registaram aumentos de 4,2 e 4,3 respectivamente.

Para um teor de sal de 30% (m/v) verificou-se, por exemplo, para o α -terpineol um aumento de quase 10 vezes (9,8) na quantidade extraída. Sendo evidente que um teor de sal de 30% (m/v) permitiu obter as melhores eficiências de extração, optou-se no entanto por usar um teor em sal de 20% (m/v), isto porque se observou para as extrações com teor máximo em sal uma menor reprodutibilidade. O coeficiente de variação médio para as extrações a 30% (m/v) em sal foi de 9,4% enquanto se registaram coeficientes de variação médios de ~5% para as extrações contendo um teor em sal inferior.

Por outro lado um teor em sal de 20% (m/v), permite ainda obter a sensibilidade desejada para o método.

5.2.4 Efeito do tempo de extracção

O estudo da cinética de extracção foi realizado por exposição da fibra durante períodos de 30, 60, 120, 180 minutos. Os ensaios foram efectuados para as condições optimizadas, a temperatura de extracção foi de 40°C, o teor em sal, NaCl, na amostra de 20% (m/v).



* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol; acetato de bornilo, acetato de geraniol

Figura 13. Estudo do efeito do tempo de extracção na eficiência do método em solução aquosa por HS-SPME. (Temperatura de extracção de 40°C, teor em sal (NaCl) de 20% (m/v))

O processo de extracção por SPME considera-se completo quando se estabelece o equilíbrio entre a amostra e a fase estacionária, isto é quando a quantidade de analito extraída se mantém constante ao longo do tempo. Observando a figura 13 verifica-se que a cinética de extracção é relativamente rápida nos primeiros 30 minutos sendo mais lenta a partir desse instante. Com a excepção do acetato de geraniol e eugenol, os restantes compostos atingem o equilíbrio no intervalo de tempo estudado. Com base nas curvas dos perfis de extracção escolheu-se um tempo de extracção de 60 minutos, pois este permite de certo modo satisfazer o compromisso entre a maior quantidade extraída e o menor tempo de análise.

Sendo verdade que a máxima sensibilidade é atingida no equilíbrio, não é no entanto obrigatório atingir o equilíbrio para a análise apresentar reprodutibilidade. A relação de proporcionalidade existente entre a quantidade extraída e a concentração inicial do analito ao longo do processo extractivo, permite trabalhar em condições de não equilíbrio.

Os resultados obtidos são concordantes com trabalhos já referenciados tais como o de Steffen e Pawliszyn (1997) e Rocha *et al.*, (2001) nos quais, para a fibra de poliacrilato, um tempo de exposição de 60 e 45 minutos respectivamente, se revelou adequado na extracção de compostos terpénicos.

O estudo de optimização realizado procurou avaliar a influência na eficiência de extracção de factores como: o tipo de fibra, a temperatura de extracção, o efeito iónico e o tempo/cinética de extracção. Os resultados obtidos permitem concluir que a extracção em *headspace* dos compostos em estudo deve ser efectuada com a fibra de poliacrilato (PA), para uma temperatura de extracção de 40°C, teor em sal (NaCl) de 20% (m/v) e para um período de exposição da fibra de 60 minutos. Por último, apresenta-se, na figura 14 um cromatograma obtido para uma mistura padrão, contendo os compostos em estudo em concentrações individuais de ~100 µg/L, após extracção por SPME nas condições optimizadas.

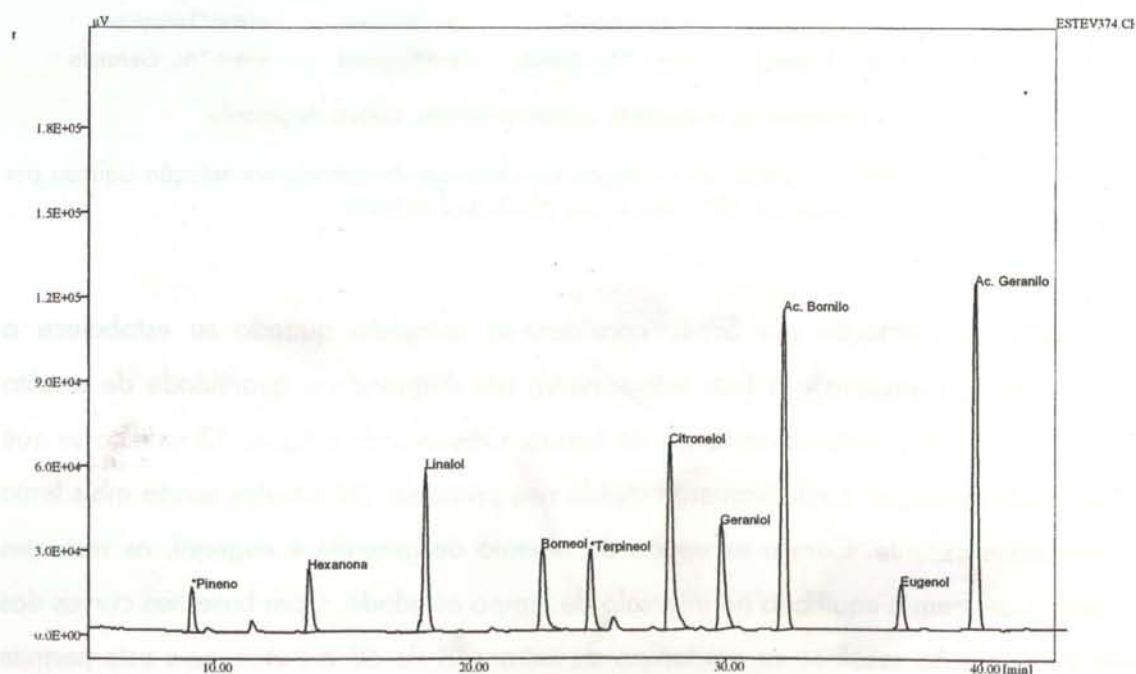


Figura 14. Cromatograma obtido para uma mistura padrão de concentração ~100 µg/L, após extracção por SPME. (* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol)

5.3 Validação do Método de Análise por SPME/GC-FID

Após os ensaios de optimização e fixados os parâmetros de extracção, procedeu-se ao desenvolvimento e validação do método analítico por SPME/GC-FID. De acordo com os resultados obtidos na optimização utilizou-se nas extracções a fibra de PA – 85 μm , um tempo de exposição de 60 minutos, temperatura de 40°C, teor de sal de 20% (m/v) na amostra. As amostras foram submetidas a agitação contínua e constante e os analitos desabsorvidos a 260°C durante 5 minutos.

Foram injectadas, em duplicado, extractos por SPME de misturas padrão em solução aquosa (1% (v/v) em etanol) a 6 níveis. Dada a diferente afinidade da fibra para os compostos foram preparadas soluções padrão com concentrações diferenciadas (ver anexo C – secção C2). Para o α -pineno a gama de concentração esteve compreendida entre 100 $\mu\text{g/L}$ e 1000 $\mu\text{g/L}$, borneol, 2,2,6 – trimetilciclohexanona, e α -terpineol foram estudados para concentrações abrangendo a gama de 25 $\mu\text{g/L}$ a 250 $\mu\text{g/L}$. A gama de concentração para o linalol esteve compreendida entre 15 $\mu\text{g/L}$ e 150 $\mu\text{g/L}$, para o citrionelol, geraniol, acetato de bornilo e geraniol entre 10 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$ e por último o eugenol com concentrações compreendidas entre 50 $\mu\text{g/L}$ e 500 $\mu\text{g/L}$. Os resultados (anexo D – secção D2) permitiram estabelecer curvas de calibração para todos os compostos em estudo, que se apresentam nas figuras seguintes.

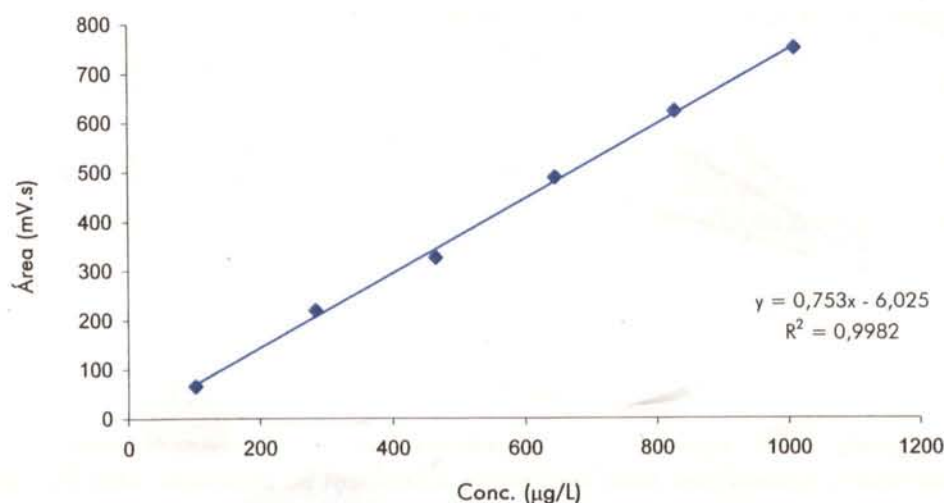


Figura 15. Curva de calibração de α -pineno usando SPME.

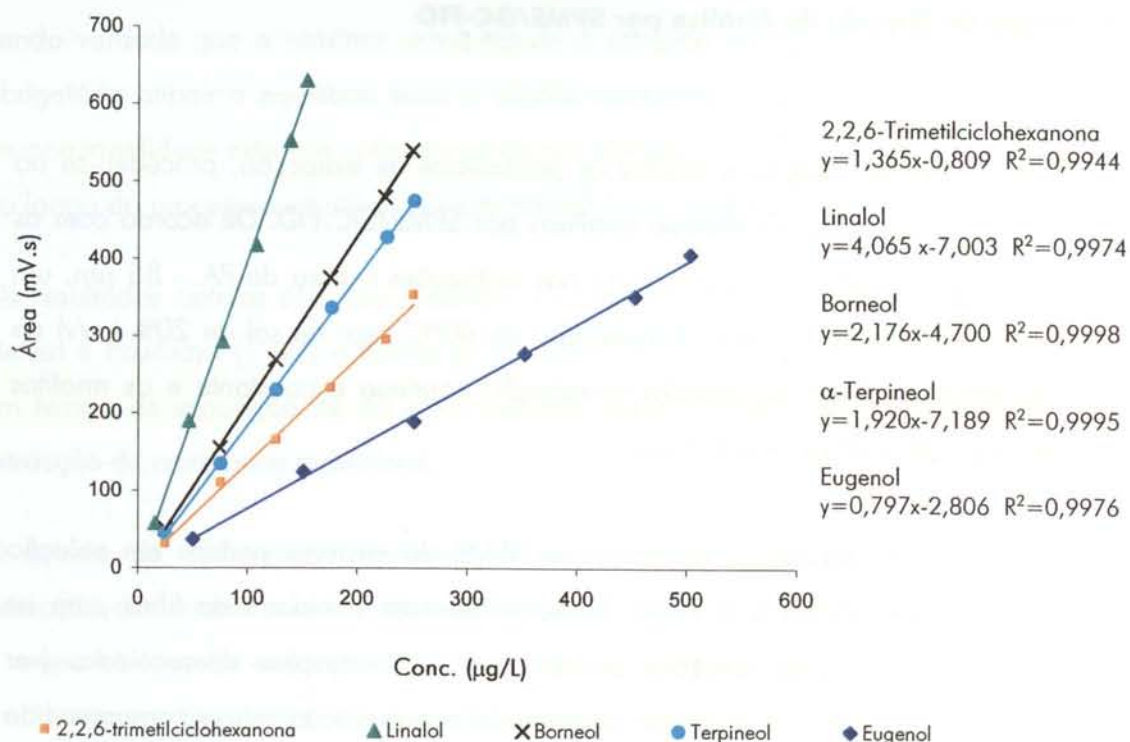


Figura 16. Curvas de calibração de extractos por SPME de padrões 2,2,6-trimetilciclohexanona, linalol, borneol, α -terpineol e eugenol.

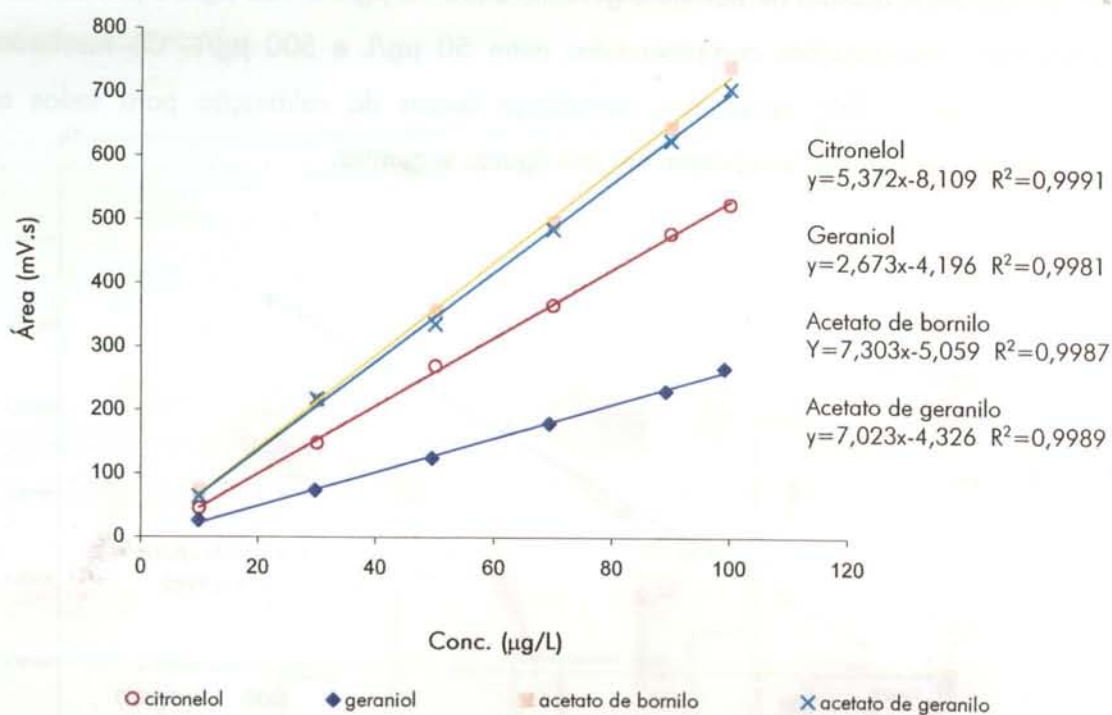


Figura 17. Curvas de calibração de extractos por SPME de padrões de citronelol, geraniol, acetato de bornilo e acetato de geraniolo.

Para o estudo da linearidade, à semelhança do efectuado para a análise por injeção directa, foram determinados alguns parâmetros estatísticos, apresentando-se os principais resultados do estudo na tabela 18. Encontram-se no anexo C (secção C3) os cálculos associados a este estudo.

Tabela 18. Resultados do estudo de linearidade da análise cromatográfica dos padrões extraídos por SPME.

Composto	Regressão linear (95%)		R ²	LD (µg/L)	CV médio (%)
	Ordenada	Declive			
α-Pineno	-6,025±27,893	0,753±0,044	0,9982	40,0	4,5
2,2,6-Trimetilciclohexanona	-0,809±23,577	1,365±0,142	0,9944	18,7	3,7
Linalol	-7,003±29,093	4,065±0,285	0,9974	7,7	3,6
Borneol	-4,700±7,286	2,176±0,044	0,9998	3,6	2,7
α-Terpineol	-7,189±9,903	1,920±0,059	0,9995	5,6	2,9
Citronelol	-8,109±14,597	5,372±0,219	0,9991	2,9	3,3
Geraniol	-4,196±10,660	2,673±0,162	0,9981	4,3	3,3
Acetato de bornilo	-5,059±24,064	7,303±0,362	0,9987	3,5	4,5
Eugenol	-2,806±18,118	0,797±0,054	0,9976	24,6	3,6
Acetato de geraniol	-4,326±21,116	7,023±0,317	0,9989	3,2	3,8

R² – coeficiente de correlação quadrático; LD – limite de detecção

CV – coeficiente de variação médio obtido para injeções em duplicado a 6 níveis de concentração

Da observação dos resultados verifica-se para todos os compostos a existência de uma boa linearidade na gama de concentrações estudada com valores do coeficiente de correlação quadrático entre 0,9975 e 0,9998. O coeficiente de variação médio (para a gama de concentração de concentrações estudada) apresenta valores inferiores a 10% para todos os analitos.

Parâmetros também importantes na validação dos resultados são os que dizem respeito ao erro do declive ($\frac{s_b}{b} \leq 5\%$) e ao intervalo de confiança da ordenada na origem ($a - ts_a < 0 < a + ts_a$).

Na tabela 19 estão reunidos os resultados relativos a estes parâmetros, encontrando-se no anexo C (ver secção C3) os cálculos realizados.

Tabela 19. Condições de linearidade para análise cromatográfica dos padrões extraídos por SPME.

Composto	Parâmetros		
	$\frac{s_b}{b}$ (%)	$a - ts_a$	$a + ts_a$
α -Pineno	2,10	-33,92	21,87
2,2,6-Trimetilciclohexanona	3,74	-24,39	22,77
Linalol	2,53	-36,10	22,09
Borneol	0,73	-11,99	2,59
α -terpineol	1,11	-17,09	2,71
Citronelol	1,47	-22,71	6,49
Geraniol	2,18	-14,86	6,46
Acetato de bornilo	1,78	-29,12	19,00
Eugenol	2,45	-20,92	15,31
Acetato de geranilo	1,63	-25,42	16,81

b – declive; a – ordenada na origem; t – t de Student (para um nível de confiança de 95%)
 s_b – desvio padrão do declive; s_a – desvio padrão da ordenada na origem

Para todos os compostos sem excepção, são cumpridas as exigências normalmente admitidas para uma correcta validação do método analítico. O erro do declive é inferior a 5% e o intervalo de confiança para a ordenada na origem inclui a própria origem.

5.3.1 Estudo da precisão e exactidão da extracção por SPME

Foram ainda realizados ensaios para avaliação da precisão da extracção por SPME. Os resultados obtidos quanto à repetibilidade e precisão intermédia estão reunidos na tabela 20. Encontram-se no anexo C (secção C4, tabelas C22 a C33) todos resultados obtidos para avaliação destes parâmetros.

Estes estudos foram realizados para o 1º nível (padrão inferior) e o 4º nível de concentração. Para o cálculo da repetibilidade, foram efectuadas seis extracções nas mesmas condições e durante o mesmo dia. A precisão intermédia foi avaliada através de vinte e um ensaios realizados em dias diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos para ambos os parâmetros de precisão foram inferiores a 10%, apresentando o método uma boa precisão mesmo para o nível de concentração inferior.

Tabela 20. Resultados para a precisão da análise cromatográfica dos padrões usando SPME.

Composto	Precisão			
	1º nível de concentração		4º nível de concentração	
	Repetibilidade	Precisão intermédia	Repetibilidade	Precisão intermédia
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
α -Pineno	4,2	8,1	6,9	8,7
*Hexanona	8,5	8,4	5,8	9,4
Linalol	6,1	8,9	3,1	7,2
Borneol	3,4	3,9	3,8	5,9
α -Terpineol	4,7	6,8	5,2	8,2
Citronelol	3,8	6,4	4,3	7,0
Geraniol	5,9	9,0	3,3	8,6
Acetato de bornilo	3,1	5,3	3,2	7,2
Eugenol	4,9	6,7	5,6	9,4
Acetato de geraniol	5,4	8,0	4,3	8,5

*2,2,6-Trimetilciclohexanona

Para avaliação da exactidão do método procedeu-se a ensaios de recuperação, utilizando como amostras os extractos de esteva obtidos por SDE. Na tabela seguinte apresentam-se as recuperações médias obtidas para os quatro níveis de concentração de padrão adicionados. Foram remetidos para o anexo C (secção C5, tabelas C34 a C41) os resultados dos ensaios e os cálculos efectuados para determinação da percentagem de recuperação.

Tabela 21. Recuperações médias obtidas nas extracções dos padrões por SPME.

Composto	Recuperação média (%)	CV (%)
α -Pineno	91,4	7,2
2,2,6-Trimetilciclohexanona	94,4	6,0
Linalol	94,9	3,4
Borneol	101,7	5,5
α -Terpineol	97,0	3,9
Citronelol	100,4	6,7
Geraniol	93,8	5,9
Acetato de bornilo	98,8	4,4
Eugenol	98,6	4,8
Acetato de geraniol	105,1	3,1

Da análise dos resultados verifica-se que os índices de recuperação obtidos foram superiores a 90% o que se pode considerar-se aceitável.

5.3.2 Eficiência de extracção

A eficiência de extracção do método de SPME foi calculada de modo a permitir uma avaliação da eficiência do próprio método na concentração dos analitos em análise. Este parâmetro permite ainda avaliar a maior ou menor afinidade de cada um dos compostos em estudo para a fibra de poliarilato (PA), algo que é no entanto já conhecido em resultado dos estudos de optimização realizados.

A determinação da eficiência do método foi possível através da comparação dos resultados obtidos na injeção directa de padrões conhecidos, e nas extracções de padrões de concentração também conhecida pelo método de SPME. Os resultados obtidos para a eficiência média de extracção são apresentados na tabela 22, encontrando-se no anexo C (secção C6, tabelas C43 a C44) todos os resultados associados a este estudo.

Tabela 22. Eficiências médias (em %) obtidas nas extracções dos padrões por SPME.

Composto	Gama de concentrações (µg/L)	Eficiência média de extracção (%)	CV (%)
α-Pineno	100,9-1008,8	4,7	3,8
2,2,6-Trimetilciclohexanona	25,0-250,4	10,8	5,6
Linalol	15,3-153,4	26,1	3,7
Borneol	24,9-249,2	15,1	4,1
α-Terpineol	25,2-251,6	14,3	2,0
Citronelol	10,0-100,1	38,9	5,9
Geraniol	9,9-99,1	21,6	5,6
Acetato de bornilo	10,0-100,1	56,0	2,1
Eugenol	50,3-502,8	7,1	3,8
Acetato de geranilo	10,0-100,1	60,8	3,2

Os resultados confirmam a diferente afinidade da fibra para os compostos em estudo, verificando-se para o acetato de bornilo e de geranilo as melhores eficiências de extracção. Pelo contrário a mais baixa eficiência de extracção é observada para o α-pineno, o que é justificado pelas características apolares deste composto, sendo o portanto de todos os analitos em estudo o que apresenta menor afinidade para a fibra de PA de natureza polar. Os álcoois monoterpénicos com valores de eficiência de extracção

compreendidos entre 14,3 e 38,9% registam, depois dos acetatos, os melhores valores de eficiência de extracção.

O método desenvolvido de extracção por HS-SPME em associação com a análise por GC-FID, revelou uma boa linearidade na gama de concentrações estudada. Os valores obtidos para o coeficiente de correlação quadrático estiveram compreendidos entre 0,9976 (linalol) e 0,9998 (borneol).

Verificaram-se, para todos os compostos sem excepção, as exigências normalmente admitidas para uma correcta validação do método analítico. O erro do declive foi inferior a 5%, apresentando o borneol o valor mais baixo para este parâmetro (0,73%) e a 2,2,6 – trimetilciclohexanona o valor mais elevado (3,74%), tendo-se obtido para todos os outros compostos valores compreendidos entre estes. Também verificada para todos os compostos foi a condição de linearidade referente à ordenada na origem.

O método desenvolvido apresenta ainda uma boa precisão e exactidão. Os coeficientes de variação obtidos para os parâmetros de precisão avaliados (repetibilidade e precisão intermédia) foram inferiores a 10%, para todos os compostos. Quanto à exactidão observaram-se valores de recuperação superiores a 90%, apresentando o α -pineno o valor mais baixo (91,4%) e o acetato de geranilo o índice de recuperação mais elevado (105,1%).

5.4 Obtenção de extractos de Esteva por Destilação – Extracção Simultânea

5.4.1 Optimização das condições de Extracção por SDE

Do conjunto de parâmetros que influenciam a eficiência de extracção por SDE assume particular importância a natureza do solvente e o tempo de extracção. O estudo de optimização efectuado resumiu-se a estes dois factores. Os restantes parâmetros (temperatura do solvente e da amostra e temperatura de arrefecimento), embora também significativos, foram fixados e mantidos constantes para todas as extracções efectuadas.

Para este estudo foram seleccionados inicialmente quatro solventes: pentano, hexano, ciclohexano e éter dietílico. Com a excepção do ciclohexano os restantes solventes são frequentemente utilizados na extracção por SDE.

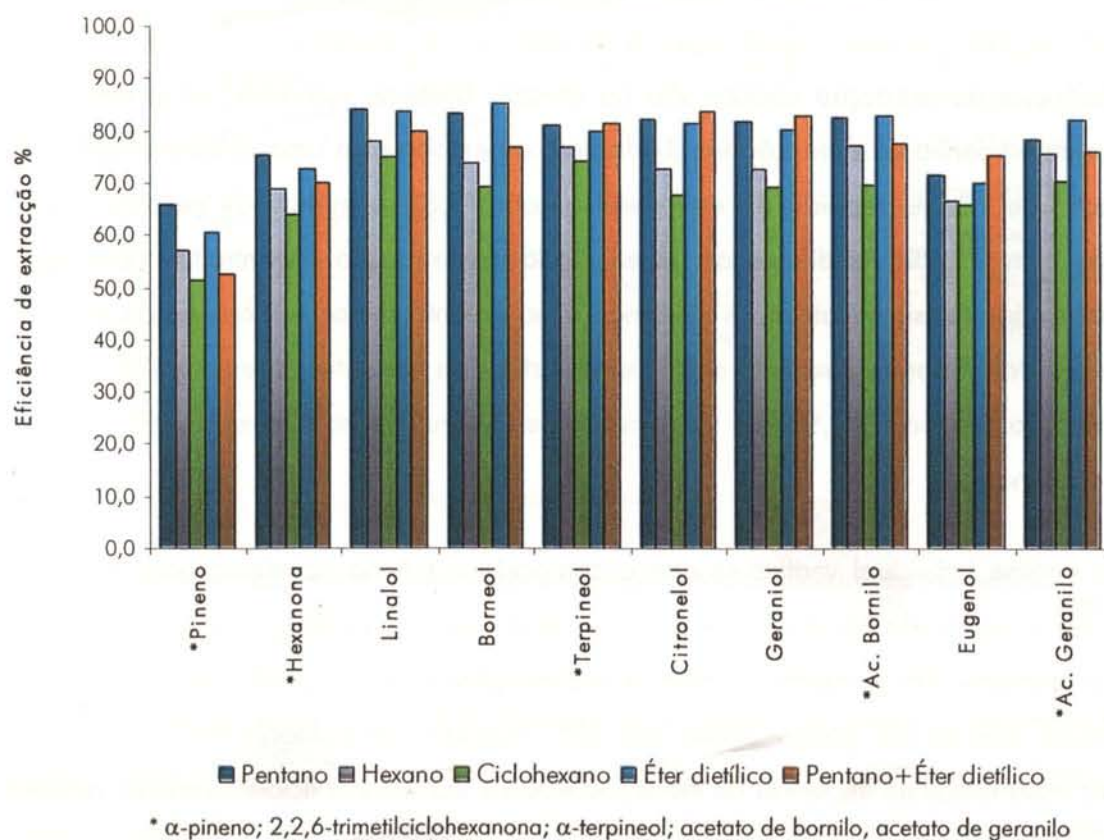
Para cada um dos solventes procedeu-se à extracção de uma solução aquosa à qual se adicionou 5 mL de solução padrão contendo os compostos em estudo em concentrações de ~ 100 mg/L. O tempo de extracção utilizado foi de 60 minutos, a temperatura de aquecimento da amostra foi de $\sim 120^{\circ}\text{C}$, os solventes foram aquecidos a temperaturas de $\sim 20^{\circ}\text{C}$ superiores aos seus pontos de ebulição e a temperatura de arrefecimento no condensador foi de $\sim 5^{\circ}\text{C}$.

Realizaram-se dois ensaios de extracção para cada solvente individualmente e para uma mistura de solvente constituída em partes iguais de pentano e éter dietílico.

Para cada conjunto de ensaios efectuados foi avaliada a eficiência de extracção apresentando-se os resultados obtidos na tabela 23 e na figura 17. Esta repetição na apresentação dos resultados permite obter simultaneamente uma visão parcelar através da consulta da tabela, enquanto o gráfico facilita a interpretação global dos resultados. Encontram-se no anexo D, secção D2, os resultados obtidos para cada ensaio e os cálculos efectuados para determinação da eficiência de extracção.

Tabela 23. Eficiências médias de extração por SDE obtidas para os vários solventes em estudo.

Solvente	Eficiência Média de Extração (%)				
	Pentano	Hexano	Ciclohexano	Éter dietílico	Pentano + Éter dietílico
α -Pineno	65,8	56,9	51,5	60,5	52,4
2,2,6-Trimetilciclohexanona	75,4	68,6	63,8	72,4	70,0
Linalol	84,2	78,0	74,9	83,8	79,9
Borneol	83,1	73,7	69,0	85,1	76,8
α -Terpineol	81,1	76,9	74,2	79,8	81,3
Citronelol	82,3	72,7	67,8	81,5	83,5
Geraniol	81,7	72,7	69,3	80,2	82,8
Acetato de bornilo	82,6	77,2	69,7	82,7	77,6
Eugenol	71,4	66,4	65,7	69,9	75,5
Acetato de geraniol	78,4	75,8	70,3	82,2	75,9

**Figura 18.** Eficiências médias de extração obtidas por SDE.

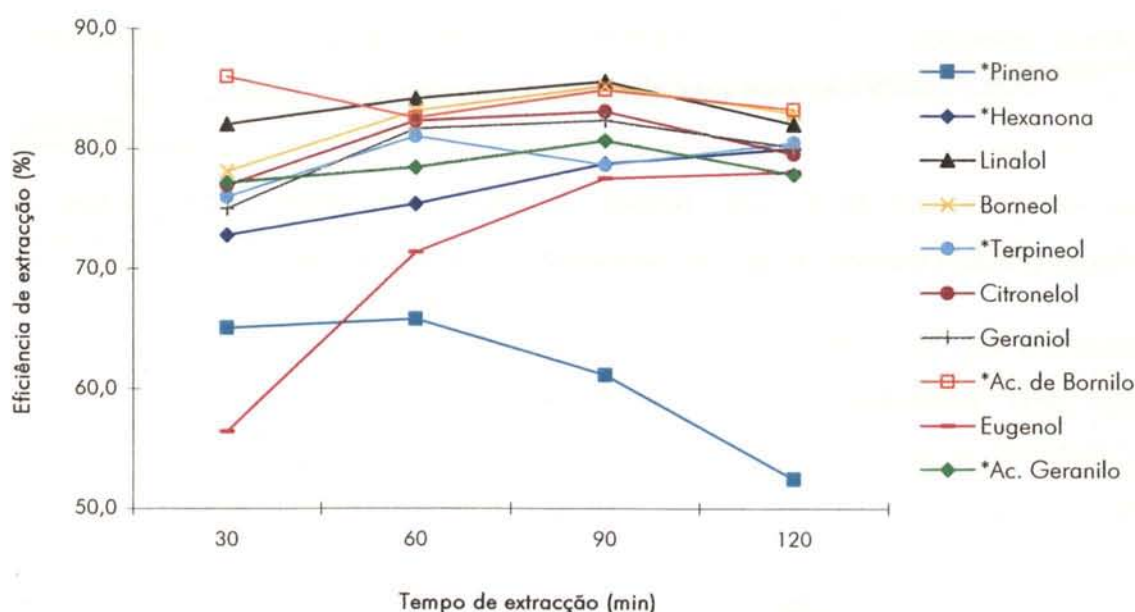
Da análise dos resultados verifica-se imediatamente que a eficiência de extracção foi sempre inferior a 100%. Não foi possível, para as condições experimentais utilizadas, obter recuperações exaustivas. Este resultado contrasta, de certo modo, com os resultados de estudos, já referenciados, obtidos para condições de extracção semelhantes às usadas neste estudo. Schultz *et al.*, apresentaram para o linalol eficiências de extracção, ao fim de 60 minutos, de 99, 97 e 99% em hexano, éter dietílico e pentano respectivamente. Recuperações exaustivas foram também conseguidas por Goodefroot *et al.*, para o linalol, α -pineno e eugenol, para um tempo de extracção de 60 minutos em diclorometano. Utilizando também diclorometano, Bouseta e Collin, conseguiram eficiências de extracção exaustivas para o α -terpineol e acetato de bornilo e de 80% para o α -pineno. A justificação para esta diferença de resultados poderá residir quer no processo extractivo, quer nos procedimentos posteriores à extracção. A versão do aparelho utilizada neste estudo implica, devido às suas dimensões, a utilização de um volume de solvente de no mínimo 30 a 50 mL. Isto tem como consequência a necessidade de evaporação do solvente podendo ocorrer durante esta etapa perda de analitos. Tanto Goodefroot *et al.* como Bouseta e Collin utilizaram nos seus estudos uma versão de menores dimensões do aparelho de SDE, na qual a evaporação do solvente não é necessária.

As eficiências de extracção obtidas são no entanto bastante razoáveis. Globalmente o melhor desempenho de extracção foi obtido para o pentano com uma eficiência média de extracção de 78,6%, seguido do éter dietílico com 77,8% e mistura de pentano e éter dietílico com 75,6%. As diferenças na eficiência de extracção encontradas para estes solventes não são significativas. A diferença é no entanto maior se comparada com os resultados dos solventes hexano e ciclohexano. Estes dois solventes apresentam eficiências de extracção inferiores, 71,9% é o valor médio de eficiência para o hexano e 67,6% para o ciclohexano.

Numa análise individual verifica-se que o composto α -pineno apresenta para todos os solventes a menor eficiência de extracção, tendo o melhor resultado, 65,8%, sido obtido para o pentano. Em contraste os álcoois monoterpénicos e o acetato de bornilo, com eficiências médias um pouco acima dos 80% registam os melhores resultados. Com valores intermédios de eficiência de extracção estão a 2,2,6-trimetilciclohexanona, acetato de geranilo e o eugenol.

Em conclusão e analisando os resultados obtidos, quer de uma perspectiva global quer individual, os solventes hexano e ciclohexano apresentaram os valores mais baixos de eficiência. Em contrapartida os melhores resultados foram obtidos com pentano, com pequenas diferenças para o éter dietílico e para a mistura de solventes. De acordo com estes resultados optou-se pelo solvente pentano para a realização das extracções posteriores, nas quais se procurou otimizar o tempo de extracção.

Tendo em conta as eficiências encontradas nos ensaios anteriores, tornou-se importante avaliar a influência do factor tempo de extracção. Nomeadamente para verificar se seria possível obter recuperações exaustivas nas condições experimentais disponíveis. As extracções foram realizadas em condições idênticas às já descritas para o estudo dos solventes, na figura seguinte estão representados os principais resultados, encontrando-se no anexo D, secção D3 todos os resultados obtidos nos ensaios.



* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona; α -terpineol; acetato de bornilo, acetato de geraniolo

Figura 19. Estudo da eficiência de extração média em função do tempo.

A partir da observação da figura 18 verifica-se que o aumento do tempo de extração não permitiu obter recuperações exaustivas para nenhum dos compostos em estudo. Se analisados globalmente os resultados não apresentam diferenças significativas. A eficiência média de extração foi de 74,6% para um tempo de extração de 30 minutos, 78,6% foi o valor obtido ao fim de 60 minutos de extração, 79,8 e 77,7% foram os valores obtidos

para um tempo de operação de 90 e 120 minutos respectivamente. O tempo de operação de 60 minutos parece assim satisfazer o compromisso entre a eficiência e o menor tempo de extracção.

Individualmente verifica-se a existência de três comportamentos distintos. Para a maioria dos compostos estudados o aumento do tempo de extracção não se traduziu em um claro aumento da eficiência. As excepções mais importantes a este comportamento ocorreram para o α -pineno e eugenol. Verificou-se no caso do α -pineno que aumento no tempo de extracção teve como consequência uma diminuição da eficiência média de 65,1 para 52,4%. O contrário foi observado para o eugenol, a eficiência de extracção deste composto aumentou de 56,4 para 78,0%.

Estes resultados podem de certo modo ser compreendidos se atendermos às características dos compostos. O α -pineno é de todos os analitos em estudo o mais volátil, podendo considerar-se que a extracção máxima ocorre ao fim 30 minutos, e que a diminuição na eficiência verificada a partir dos 60 minutos se deve a perdas por volatilização. Comportamento semelhante para este composto foi reportado por Bousseta e Collin, num estudo já referenciado. Quanto ao eugenol é de todos os compostos o que apresenta maior ponto de ebulição e menor pressão de vapor, tendo deste modo o tempo de extracção grande influência na sua recuperação.

5.4.2 Reprodutibilidade e Exactidão do Processo de Extração por SDE

Para avaliação da reprodutibilidade da extração, realizaram-se seis ensaios em condições idênticas às descritas para os ensaios de optimização, usando pentano como solvente e um tempo de extração de 60 minutos e uma mistura aquosa contendo os compostos em estudo. Os resultados apresentam-se na tabela 24. No anexo D, secção D4, tabelas D30 a D36, apresentam-se todos resultados.

Tabela 24. Valores obtidos para o estudo da reprodutibilidade da extração por SDE.

Composto	Eficiência de extração média (%)	CV (%)
α -Pineno	64,7	5,4
2,2,6-Trimetilciclohexanona	75,7	4,6
Linalol	83,8	3,5
Borneol	84,6	4,7
α -Terpineol	82,1	3,7
Citronelol	81,0	4,4
Geraniol	82,4	3,6
Acetato de bornilo	81,7	4,9
Eugenol	70,8	5,5
Acetato de geranilo	79,2	4,8

Analisando-se os valores de coeficiente de variação obtidos verifica-se que o processo extractivo apresenta para as condições experimentais de operação uma baixa variabilidade. Estes resultados estão de acordo com o que se encontra na literatura. As elevadas eficiências de extração que a técnica de SDE permite aliadas a uma baixa variabilidade nos resultados contribuem para que seja frequentemente utilizada na extração de voláteis presentes em diferentes matrizes.

Para avaliação da exactidão do método extractivo e da eventual existência de efeito de matriz realizaram-se ensaios de recuperação. Para o efeito procedeu-se à extração de amostras de esteva com adição de padrão contendo todos os compostos em estudo.

As restantes condições de operação mantiveram-se constantes. Foram realizados três ensaios apresentando-se na tabela seguinte os índices de recuperação médios obtidos. Encontram-se no anexo D (secção D5, tabelas D37 a D43) todos os resultados obtidos.

Tabela 25. Recuperações médias obtidas por SDE.

Composto	Recuperação média (%)	CV (%)
α -Pirino	73,4	12,4
2,2,6-Trimetilciclohexanona	80,4	9,5
Linalol	87,1	8,3
Borneol	90,2	14,5
α -Terpineol	78,2	7,0
Citronelol	77,9	5,1
Geraniol	76,2	7,3
Acetato de bornilo	87,2	8,7
Eugenol	75,5	7,5
Acetato de geraniol	82,0	12,1

Quando comparados os valores obtidos para a recuperação com os determinados para a eficiência de extração (tabela 24) verifica-se que estes últimos são de um modo geral um pouco inferiores. Os ensaios de recuperação apresentaram no entanto uma maior variabilidade, verificando-se para alguns compostos coeficientes de variação superiores a 10%. Esta maior variabilidade observada para os ensaios de recuperação compreende-se atendendo à natureza da matriz (folhas de esteva). De facto e apesar de correctamente acondicionada é impossível garantir que não ocorram durante o período de armazenamento alterações e volatilizações.

5.5 Análise dos Extractos de Esteva isolados por SDE

Para avaliação qualitativa e quantitativa do óleo essencial de Esteva isolado por SDE, procedeu-se a um conjunto de seis ensaios de extracção. As condições de operação usadas foram as definidas nos ensaios prévios de optimização. As amostras foram extraídas durante 60 minutos e recuperadas em pentano. Utilizaram-se temperaturas de amostra aquosa, de solvente e de arrefecimento de $\sim 120^{\circ}\text{C}$, $\sim 50^{\circ}\text{C}$ e $\sim 5^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Os extractos finais obtidos foram analisados por SPME/GC-FID, para as condições optimizadas utilizando SPME. A temperatura de extracção foi de 40°C , o teor em sal na amostra de 20% (m/v), o tempo de extracção de 60 minutos e a fibra usada foi a de poliacrilato PA – 85 μm . Na figura 19 reproduz-se o cromatograma obtido para um dos extractos analisados.

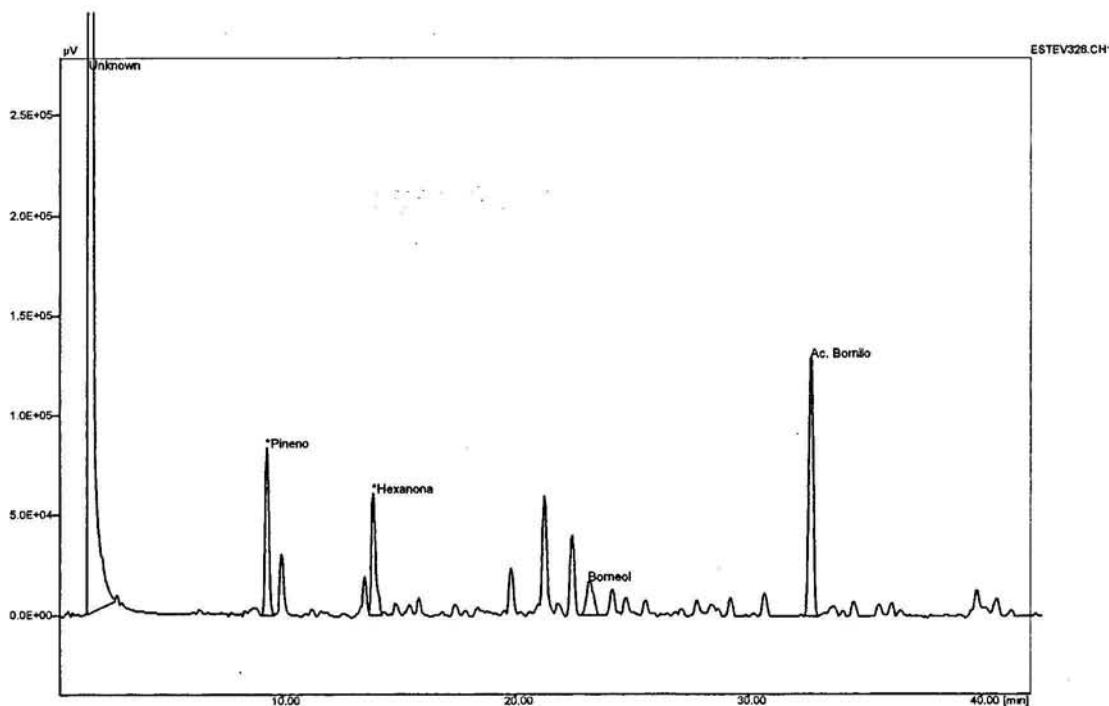


Figura 20. Cromatograma de um extracto de Esteva por SPME/GC-FID.
(* α -pineno; 2,2,6-trimetilciclohexanona)

Da observação da figura 20 verifica-se que os extractos apresentam alguma complexidade. As condições cromatográficas foram optimizadas de modo a obter a melhor separação e maior resolução cromatográfica possível.

Foi possível, nestas condições, identificar e quantificar nos extractos quatro dos compostos em estudo. Dos álcoois monoterpénicos apenas foi identificado e quantificado o borneol. O α -pineno, 2,2,6-trimetilciclohexanona e o acetato de bornilo são os restantes compostos detectados e quantificados.

Na tabela 26 resumem-se os resultados obtidos para as seis extracções efectuadas. Apresentam-se as concentrações médias obtidas e o coeficiente de variação. Os valores de concentração apresentados referem-se aos extractos de Esteva obtidos por SDE. Para a análise destes, por SPME/GC-FID, foi necessário proceder a diluições encontrando-se no anexo E os resultados obtidos para cada ensaio realizado.

Tabela 26. Concentrações médias dos compostos identificados nos extractos de Esteva isolados por SDE.

Composto	Conc. Média (mg/L)	CV (%)
α -Pineno	393,4	11,0
2,2,6-Trimetilciclohexanona	108,5	7,0
Linalol	n.d	-
Borneol	52,3	13,2
α -Terpineol	n.d	-
Citronelol	n.d	-
Geraniol	n.d	-
Acetato de bornilo	68,6	8,7
Eugenol	n.d	-
Acetato de geraniol	n.d	-

Dos compostos identificados nos extractos de Esteva isolados por SDE, α -pineno apresenta-se como constituinte maioritário. Este era um resultado de certo modo esperado uma vez que em alguns estudos, já referenciados, α -pineno foi identificado como sendo o principal constituinte do óleo essencial de Esteva.

Na comparação entre os resultados aqui apresentados e os obtidos em outros estudos, há que ter em atenção que quer os métodos de extracção usados quer os objectivos foram diferentes. É no entanto possível e interessante analisar comparativamente os resultados.

Os quatro compostos identificados nos extractos aparecem referenciados nos estudos de Simon-Fuentes *et al.*, 1986 e de Gülz et Königs (citado por Peyron e Alessandri, 1986)

como fazendo parte dos principais constituintes do óleo essencial de Esteva. Num estudo mais recente (Mariotti *et al.*, 1997), o α -pineno, a 2,2,6-trimetilciclohexanona, o borneol e o acetato de bornilo foram igualmente identificados no óleo essencial de Esteva, apresentando-se o α -pineno como principal constituinte. A 2,2,6-trimetilciclohexanona e o borneol aparecem no estudo de Freitas *et al.*, 1999 como fazendo parte dos principais constituintes observados em um extracto de Esteva.

Qualitativamente os resultados obtidos não diferem muito dos encontrados na literatura, a maior diferença reside no facto de não ter sido detectada a presença de linalol, α -terpineol, geraniol, eugenol e acetato de geranilo. O que nos pode permitir concluir que a existirem estes compostos se encontram em quantidades inferiores às que são possíveis de detectar pelo método implementado.

6 Conclusões

Procurou-se neste trabalho caracterizar os extractos de esteva isolados por SDE, com vista a uma eventual valorização do recurso natural que esta espécie representa. O trabalho pode considerar-se dividido em duas fases. Numa das fases procedeu-se à implementação e validação do método de análise dos extractos, enquanto na outra se procurou estudar o próprio método de extracção (SDE) com a vista à sua optimização.

Reconhecendo-se a complexidade das misturas dos óleos essenciais, optou-se pela técnica de SPME em headspace, aproveitando a selectividade das fibras para simplificar a análise. Procedeu-se inicialmente à optimização das condições de extracção por esta técnica. Das fibras disponíveis (PDMS e PA), a de poliacrilato (PA) revelou maior afinidade para os compostos considerados de maior interesse neste estudo, os álcoois monoterpénicos. Utilizando a fibra de poliacrilato avaliou-se o efeito da temperatura, da força iónica e do tempo de exposição da fibra na eficiência de extracção. Os resultados obtidos permitiram estabelecer como melhores condições de análise para os compostos em estudo, a temperatura de extracção de 40°C, teor de sal (NaCl) na amostra de 20% (m/v), com agitação constante e um tempo de exposição da fibra de 60 minutos. O método de análise foi validado conseguindo-se boa linearidade na gama de concentrações estudada e elevada precisão. Os coeficientes de variação apresentaram-se inferiores a 10% para todos os compostos e os índices de recuperação foram superiores a 90%.

Quanto ao método de extracção (SDE) avaliou-se a sua eficiência de extracção e a influência dos parâmetros solvente e tempo de operação. Os restantes parâmetros, temperatura do solvente e da amostra e temperatura de arrefecimento, foram fixados e mantidos constantes para todas as extracções efectuadas. Foram seleccionados quatro solventes e avaliada a sua influência, em condições iguais, na eficiência de extracção dos compostos. Para as condições de operação utilizadas a eficiência de extracção foi sempre inferior a 100%. O melhor desempenho de extracção foi obtido para o pentano com uma eficiência média de extracção de 78,6%. O pentano apresentou ainda como vantagem o facto do seu ponto de ebulição (~35°C) permitir a sua remoção sob vácuo sem necessidade de aquecimento, minimizando-se eventuais perdas e degradação

térmica de compostos. O éter dietílico e a mistura de pentano e éter dietílico apresentaram igualmente bons resultados com ligeiras diferenças do pentano.

As menores eficiências de extracção foram obtidas para o hexano e ciclohexano, o que é razoável pois estes dois solventes apresentam maior ponto de ebulição, podendo as menores eficiências encontradas serem justificadas por ocorrências de perdas (dos analitos) em particular na operação de evaporação do solvente, embora também sejam os solventes mais apolares utilizados neste trabalho, justificando-se a menor eficiência de extracção, em particular, para os compostos mais polares como por exemplo os álcoois monoterpénicos.

O estudo da influência do tempo de extracção foi avaliado para períodos de operação de 30, 60, 90 e 120 minutos. O aumento do tempo de extracção não permitiu obter recuperações exaustivas, concluindo-se que o tempo de 60 minutos representava o melhor compromisso entre a eficiência e o menor tempo de extracção. A reprodutibilidade do método foi ainda avaliada para uma mistura aquosa contendo os compostos em estudo verificando-se que os coeficientes de variação foram para todos os compostos inferiores a 10%, sendo de 4,5% o valor do coeficiente médio de variação para o processo. Nos ensaios de recuperação realizados, para avaliação da exactidão do método extractivo e da eventual existência de efeito de matriz, os valores encontrados foram um pouco superiores aos obtidos para eficiência de extracção em solução aquosa. A diferença encontrada pode ser entendida como inerente à natureza do próprio material vegetal, sendo impossível garantir que este não sofra alterações durante o período de tempo em que está armazenado, mas pode também ser resultado da própria complexidade da composição dos extractos.

A utilização da técnica de SPME para a análise dos extractos revelou-se vantajosa, pois permitiu simplificar a matriz por efeito da diluição que permitiu e também por apresentar alguma selectividade. O objectivo do trabalho era identificar e quantificar a presença de um conjunto de compostos e não avaliar a composição total dos extractos de esteva. Deste modo a opção pela técnica de SPME permitiu analisar os extractos sem ter que proceder ao seu fraccionamento, prática comum sempre que se pretende analisar exaustivamente a composição de um óleo essencial.

As condições cromatográficas para a análise dos extractos foram optimizadas de modo a obter a melhor separação e maior resolução cromatográfica possível. Verificaram-se

no entanto sobreposição de compostos não identificados, apresentando-se a linha de base com algum "ruído", o que pode ter também contribuído para, a já referida, diferença obtida entre a eficiência de extracção (SDE) em solução aquosa e os índices de recuperação na matriz.

A análise dos extractos permitiu identificar e quantificar quatro dos compostos em estudo, α -pineno, 2,2,6-trimetilciclohexanona, borneol e o acetato de bornilo. Com a excepção do borneol não foi possível detectar nos extractos os restantes álcoois monoterpénicos em estudo. A composição apresentada pelos extractos obtidos por SDE bem como a concentração dos compostos identificados não permitem encarar a valorização deste recurso (esteva) pelo menos de acordo com os objectivos iniciais deste trabalho.

Será no entanto interessante proceder em trabalho futuro à obtenção de extractos, por esta técnica, utilizando no entanto outros solventes, nomeadamente de características mais polares, de modo a obter maiores eficiências de extracção e também, se possível, uma maior selectividade.

Importante será também recorrer à identificação dos compostos presentes nos extractos por GC/MS, de modo a garantir a sua identificação mas também explorar a própria composição dos extractos.

A obtenção de extractos de esteva por extracção supercrítica com CO_2 (que não foi possível de concretizar neste trabalho pelas razões já mencionadas na introdução) é também um aspecto a considerar futuramente. Sabendo-se que diferentes processos de extracção conduzem normalmente a produtos finais com composição diversa e que a extracção supercrítica permite extrair em maior percentagem os constituintes oxigenados (Reverchon, 1997), será interessante proceder à extracção de esteva por esta técnica.

Factor também importante e que não foi possível avaliar é o que está relacionado com a influência do ciclo vegetativo no teor em óleo essencial e na sua composição.

7 BIBLIOGRAFIA

- Ai J., "Headspace Solid Phase Microextraction. Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium", *Analytical Chemistry*, 69, 1997, pp. 3260-3266.
- Alpendurada M. F., "Solid Phase Microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis", *Journal of Chromatography A*, 889, 2000, pp. 3-14.
- Alvarenga P., Araújo M. F., Silva J., "Phytoremediation: A study of metals in the soil-plant system in Aljustrel's mining area regarding *Cistus ladanifer* L.", 1st International Meeting of Aromatic and Medicinal Plants of the Mediterranean, 1998.
- Amaral F.J., "Nova Flora de Portugal-Continente e Açores", Lisboa, 1971, vol. I.
- Ansorena D., Gimeno O., Astiasarán I., Bello J., "Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: Chorizo de Pamplona", *Food Research International*, 34, 2001, pp. 67-75.
- Arthur L.C., Killan M. L., Bucholz D. K., Pawliaszyn, J., "Automation and Optimization of Solid-Phase Microextraction", *Analytical Chemistry*, 64, 1992, pp. 1960-1966.
- Augusto F., Valente A., Tada E., Rivellino S., "Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction – gas chromatography- mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 873, 2000, pp. 117-127.
- Barták P., Frnková P., Čáp L., "Determination of phenols using simultaneous steam distillation-extraction", *Journal of Chromatography A*, 867, 2000, pp. 281-287.
- Bicchi C., Drigo S., Rubilo P., "Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants", *Journal of Chromatography A*, 892, 2000, pp. 469-485.
- Boelens M. H., "Production, Chemistry and Sensory Properties of Natural Isolates", *Flavours and Fragrance: Proceedings of the 1997 RSC/SCI International Conference*, 1997, pp. 71-85.
- Bruneton J., "Pharmacognosy-Phytochemistry Medicinal Plants", Lavoisier Publishing Inc., 2nd edition, 1999.

- Buchbauer G., Jäger W., Jirovetz L., Ilmberger J., Dietrich H., "Therapeutic Properties of Essential Oils and Fragrances", Bioactive volatile Compounds from Plants, ACS Symposium Series 525, American Chemical Society, Washington, 1993, pp. 159-185.
- Buchbauer G., Jirovetz L., Nikiforov A., "Use of GC-FID, GC-FTIR-MS, and Olfactory Characterisation in the Analysis of Essential Oils and Plant Extracts", Modern Methods of Plant Analysis, vol. 19, Springer, 1997, pp 97-111.
- Calkin R. R., Jellinek J. S., "Perfumery: Practice and Principles", John Wiley, New York, 1994.
- Campos M. G., Proença da Cunha A., Markham K. R., "*Cistus ladanifer* L. as a major source of Portuguese bee-pollen", 1st International Meeting of Aromatic and Medicinal Plants of the Mediterranean, 1998.
- Careri M., Mangia A., Mori G., Musci M., "A new multivariate approach for the optimisation of the simultaneous distillation-extraction technique for free fatty acids using a face centre cube experimental design: application to Parmigiano-Reggiano cheese", *Analytica Chimica Acta*, 386, 1999, pp. 169-180.
- Castro J. M., Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A., "Synthesis of Ambrox® from labdanolic acid", *Tetrahedron*, 58, 2002, pp. 5941-5949.
- Chaintreau A., "Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review", *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 2001, pp. 136-148.
- Chaves N., Sosa T., Alías J. C., Escudero J. C., "Identification and effects of interaction phytotoxic compounds from exudate of *Cistus ladanifer* leaves.", *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2001, pp. 611-621.
- Chaves N., Sosa T., Escudero J. C., "Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils", *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2001, pp. 623-631.
- Cowan M. M., "Plant Products as Antimicrobial Agents", *Clinical Microbiology Reviews*, vol.12, 4, 1999, pp. 564-582.
- Das M., Ram G., Singh A., Mallavarapu G. R., Ramesh S., Ram M., Kumar S., "Volatile constituents of different plant parts of *Chamomilla recutita* L. Rausch grown in the Indo-Gangetic plains", *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 2002, pp. 9-12.

Dias L. S., Moreira I., "Interaction between water soluble and volatile compounds of *Cistus ladanifer* L.", *Chemoecology*, 12, 2002, pp. 77-82.

Directiva 79/409/CEE do Conselho do Parlamento Europeu, de 2 de Abril de 1979, relativa à conservação das aves selvagens.

http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/1979/pt_1979L0409_do_001.pdf

(activo em Abril de 2003)

Directiva 92/43/CEE do Conselho do Parlamento Europeu, de 21 de Maio de 1992, relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens.

http://europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/1992/pt_1992L0043_do_001.pdf

(activo em Abril de 2003)

Dorman H. J. D., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Deans S. G., "In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components", *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 2000, pp. 12-16.

Dudareva N., Pichersky E., "Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents", *Plant Physiology*, 2000, 122, pp. 627-633.

Eskilsson C. S., Björklund E., "Analytical-scale microwave-assisted extraction" *Journal of Chromatography A*, 902, 2000, pp. 227-250.

F. B., "Le Ciste Andalou: Artisanat et Industrie", *Parfums Cosmétiques Actualités*, 138, 1997, pp. 70-71.

Field J. A., Nickerson G., James D. D., Heider C., "Determination of Essential Oils in Hops by Headspace Solid-Phase Microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, pp. 1768-1772.

Guillén M. D., Manzanos M. J., "Study of the composition of different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant", *Food Chemistry*, 63, 3, 2000, pp. 373-383.

Hawthorne S. B., Krieger S., Miller D. J., "Analysis of Flavor and Fragrance Compounds using Supercritical Fluid Extraction Coupled with Gas Chromatography", *Analytical Chemistry*, 60, 1988.

Hill R. A., "The Chemistry of natural products", Chapman-Hall, London, 1993, pp. 106-135.

- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A. M., Cavrini V., "GC/MS evaluation of thyme (*Tymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 2002, pp. 697-700.
- Huie C. W., "A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants", *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 2002, pp. 23-30.
- Ibáñez E., Oca A., Murga G., López-Sebastián S., Tabera J., Reglero G., "Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Pre-processed Rosemary Plants", *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47.
- Incêndios Florestais – 2001, Relatório Provisório, Direcção Geral das Florestas, DSVPF Divisão de Protecção e Conservação Florestal, Fevereiro 2001.
<http://www.dgf.min-agricultura.pt/v4/dgf/ficheiros/20020308143621DSVPF-P.pdf>
(activo em Abril de 2003)
- Inventário Florestal Nacional, 3ª Revisão, 2001.
<http://www.dgf.min-agricultura.pt/ifn/index.htm> (activo em Abril de 2003)
- Kataoka H., Lord H., Pawliszyn J., "Applications of solid-phase microextraction in food analysis", *Journal of Chromatography A*, 880, 2000, pp. 35-62.
- Lockwood G. B., "Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices", *Journal of Chromatography A*, 936, 2001, pp. 23-31.
- Lord H., Pawliszyn J., "Evolution of solid-phase microextraction technology", *Journal of Chromatography A*, 885, 2000, pp. 153-193.
- Luque de Castro M. D., Jiménez-Carmona M. M., Fernández-Pérez V., "Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants", *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 1999, pp. 708-716.
- Mariotti J. P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A. F., "Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France)", *Flavour and Fragrance Journal*, 12, 1997, pp. 147-151.
- Marriott P. J., Shellie R., Cornwell C., "Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils", *Journal of Chromatography A*, 936, 2001, pp. 1-22.

Miller E. M., Stuart D. J., "Comparison of Gas-Sampled and SPME - Sampled Static Headspace for the Determination of Volatile Flavor Components", *Analytical Chemistry*, 71, 1999, pp. 23-27.

Milner C. P., Trengove R. D., Bignell C. M., Dunlop P. J., "Supercritical CO₂ Extraction of the Essential Oils of Eucalypts: A Comparison with Other Methods", *Plant Volatile Analysis*, Springer, Berlin, 1997, pp. 142-155.

Moyler D. A., Clery R. A., "The Aromatic Resins: Their Chemistry and Uses", *Plant Volatile Analysis*, Springer, Berlin, 1997, pp. 96-107.

Mrabet N., Lahlou H., Benjilali B., "Effet de quelques extraits du ciste ladanifère du Maroc (*Cistus ladaniferus* L.) sur la croissance de quatre champignons", *Cryptogamie Mycol.*, 20, 1999, pp. 23-33.

Nagai T., Inoue R., Inoue H., Suzuki N., "Scavenging capacities of pollen extracts from *cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals", *Nutrition Research*, 22, 4, 2002, pp. 519-526.

Pascual-Teresa J., Bellido I. S., Basabe P., Marcos I. S., Ruano L. F., Urones J. G., "Labdane Diterpenoides from *Cistus ladaniferus*", *Phytochemistry*, 21, 1982, pp. 899-901.

Pastor-Villegas J., Durán-Valle C. J., "Pore structure of activated carbons prepared by carbon dioxide and steam activation at different temperatures from extracted rockrose", *Carbon*, 40, 2002, pp. 397-402.

Pastor-Villegas J., Gómez-Serrano V., Durán-Valle C. J., Higes-Rolando F. J., "Chemical Study of extracted rockrose and of chars and activated carbons prepared at different temperatures", *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*, 50, 1999, pp. 1-16.

Pawliszyn J., "Solid Phase Microextraction-theory and practice", Wiley-VHC, New York, 1997.

Penton Z., "Characterization of Flavor Components in Wines with Solid-Phase Microextraction (SPME), GC and GC/MS", *Varian Application Note* 6, 1998.

Pereira S. I., Santos P. A. G., Barroso J. G., Figueiredo A. C., Pedro L. G., Salgueiro L. R., Deans S. G., Scheffer J. J. C., "Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores)", *Phytochemistry*, 55, 2000, pp. 241-246.

- Peyron L., Alessandri A., "Huile essentielle de feuillage de *Cistus Ladaniferus* L. cultivé en Corse", *Parfums Cosmétiques Arômes*, 67, 1986, pp. 59-67.
- Pichersky E., Gershenzon J., "The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense", *Current Opinion in Plant Biology*, vol.5, 3, 2002, pp. 237-243.
- Programa de Acção para o Sector Florestal, Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, Fevereiro de 2003.
<http://www.dgf.min-agricultura.pt/v4/dgf/ficheiros/20030323205054PF.pdf>
(activo em Abril de 2003)
- Quer P. F., "Plantas Medicinales", Editorial Labor S. A., 1961, pp. 280-282.
- Ragunathan N., Krock K. A., Klawun C., Sasaki T. A., Wilkins C. L., "Gas chromatography with spectroscopic detectors", *Journal of Chromatography A*, 856, 1999, pp. 349-397.
- Ramalho P. S., Freitas V. A. P., Macedo A., Silva G., Silva A. M. S., "Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves", *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 1999, pp. 300-302.
- Reverchon E., "Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products", *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 1997, pp. 1-37.
- Reverchon E., Della Porta G., "Supercritical CO₂ Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes", *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1995, pp. 1543-1547.
- Reverchon E., Donsi G., Pota F., "Extraction of Essential Oils Using Supercritical CO₂: Effect of Some Process and Pre-process Parameters", *Ital. J. Food Science*, 3, 1992.
- Reverchon E., Senatore F., "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Chamomile Essential Oil and its Analysis by Gas Chromatography - Mass Spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1994, pp.154-158.
- Rocha S., Ramalheira V., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M. A., "Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in Relative Response Factors in a Wine Model", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2001, pp. 5142-5151.



Rohloff J., "Monoterpene Composition of Essential Oil from Peppermint (*Mentha x piperita* L.) with Regard to Leaf Position Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999, pp. 3782-3786.

Rohloff J., "Essential Oil Composition of Sachalinmint from Norway Detected by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis" *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, pp. 1543-1547.

Seidel V., Lindner W., "Universal Sample Enrichment Technique of Organochlorine Pesticides in Environmental and Biological Samples Using a Redesigned Simultaneous Steam Distillation-Solvent Extraction Apparatus", *Anal. Chem.*, 65, 1993, pp. 3677-3683.

Shang C., Hu T., Deng C., Hu K., "Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction", *Journal of Chromatography A*, 942, 2002, pp. 283-288.

Simon-Fuentes A., Sendra J. M., Cuñat P., "Neutral Volatiles of *Cistus Ladaniferus* L. Essential Oil", *Anales de Química*, 1987, pp. 201-204.

SRC – PhysProp Database

<http://esc.syrres.com/interkow/PhysProp.htm> (activo em Abril de 2003)

Steffen A., Pawliszyn J., "Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1996, pp. 2187-2193.

Supelco, Application Note 95, "Optimizing SPME: Parameters to Control to Ensure Consistent Results", Bellefonte, 1996.

Tabacik C., Bard M., "Etude Chimio-Taxonomique dans le genre *Cistus*", *Phytochemistry*, 10, 1971, pp. 3093-3109.

Teisseire P.J., "Chemistry of Fragrant Substances", Wiley-VHC, New York, 1994.

Urones J. G., Basabe P., Marcos I. S., Díez Martín D., Sexmero M. J., Peral M. H., Broughton H. B., "Chemistry of labdanediol from *Cistus ladaniferus*, L. synthesis of 12-nor-ambreinolide and α and β -levantenolides", *Tetrahedron*, 48, 1992, pp. 10389-10398.

Urones J. G., Basabe P., Marcos I. S., González J. L., Jiménez V., Sexmero M. J., Lithgow A. M., "Ambergis compounds from labdanolic acid", *Tetrahedron*, 48, 1992, pp. 9991-9998.

Yang X., Peppard T., "Solid-phase Microextraction for Flavor Analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1994, pp. 1925-1930.

Zhang Q. H., Jia M., Min B. D., "Optimization of Solid-Phase microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1998, pp. 2744-2747.

Zhang Z., Pawliszyn J., "Headspace Solid-Phase Microextraction", *Analytical Chemistry*, 65, 1993, pp. 1843-1852.

Zhang Z., Yang M. J., Pawliszyn, J., "Solid-Phase Microextraction", *Analytical Chemistry*, 66, 1994, pp. 844 -853.

ANEXO A

Resultados obtidos nas Calibrações, por Injecção Directa, para os compostos
em estudo

Lista de Tabelas

A1. Preparação dos Padrões Analíticos para Injecção Directa.....	106
Tabela A1. Concentrações das soluções padrão mãe.....	106
Tabela A2. Concentrações das soluções padrão de calibração.....	106
A2.Resultados obtidos nas Calibrações por Injecção Directa.....	107
Tabela A3. Valores obtidos na injecção directa de padrões de calibração.....	107
A3.Dados relativos ao estudo de linearidade – Calibração por Injecção Directa.....	108
Tabela A4. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	109
de linearidade para α -Pineno (valores em mV.s)	
Tabela A5. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	110
de linearidade para 2,2,6-trimetilciclohexanona (valores em mV.s)	
Tabela A6. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	110
de linearidade para Linalol (valores em mV.s)	
Tabela A7. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	110
de linearidade para Borneol (valores em mV.s)	
Tabela A8. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	111
de linearidade para α -Terpineol (valores em mV.s)	
Tabela A9. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	111
de linearidade para Citronelol (valores em mV.s)	
Tabela A10. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	111
de linearidade para Geraniol (valores em mV.s)	
Tabela A11. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	112
de linearidade para Acetato de bornilo (valores em mV.s)	
Tabela A12. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	112
de linearidade para Eugenol (valores em mV.s)	
Tabela A13. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	112
de linearidade para Acetato de geraniol (valores em mV.s)	
Tabela A14. Parâmetros de estudos de linearidade.....	112
(para nível de confiança de 95 %, $n=5$ $t=3,182$)	
Tabela A15. Intervalos de confiança para declive e ordenada na origem.....	113
(para nível de confiança de 95 %)	
Tabela A16. Limites de detecção.....	113
A4.Ensaio de Precisão por Injecção Directa.....	113
Tabela A17. Ensaio de repetibilidade.....	113
Tabela A18. Ensaio de precisão intermédia para o α -Pineno e 2,2,6-Trimetilciclohexanona.....	114
Tabela A19. Ensaio de precisão intermédia para o Linalol e Borneol.....	114
Tabela A20. Ensaio de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol.....	115
Tabela A21. Ensaio de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo.....	115
Tabela A22. Ensaio de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geraniol.....	116

A1. Preparação dos Padrões Analíticos para Injecção Directa

As soluções mãe utilizadas foram preparadas do seguinte modo:

1. Solução mãe de ~2500 mg/L: Pesaram-se rigorosamente ~125,0 mg de composto e diluíram-se em etanol, para balão volumétrico de 50 mL.

Tabela A1. Concentrações das soluções padrão mãe.

Composto	Massa (mg)	Conc. (mg/L)
α -Pineno	126,1	2522
2,2,6-Trimetilciclohexanona	125,2	2504
Linalol	129,51	2590,2
Borneol	124,6	2492
α -Terpineol	126,3	2526
Citronelol	125,1	2502
Geraniol	123,9	2478
Acetato de Bornilo	125,1	2502
Eugenol	125,7	2514
Acetato de Geranilo	125,1	2502

2. A partir das soluções mãe foram preparadas misturas padrão, em etanol, para a calibração.

Tabela A2. Concentrações das soluções padrão de calibração.

Balão Volume (μ L)	25 mL				
	100	250	500	750	1000
	Conc. (mg/L)				
α -Pineno	10,1	25,2	50,4	75,7	100,9
2,2,6- Trimetilciclohexanona	10,0	25,0	50,1	75,1	100,2
Linalol	10,4	25,9	51,8	77,7	103,6
Borneol	10,0	24,9	49,8	74,8	99,7
α -Terpineol	10,1	25,3	50,5	75,8	101,0
Citronelol	10,0	25,0	50,0	75,1	100,1
Geraniol	9,9	24,8	49,6	74,3	99,1
Acetato de Bornilo	10,0	25,0	50,0	75,1	100,1
Eugenol	10,1	25,1	50,3	75,4	100,6
Acetato de Geranilo	10,0	25,0	50,0	75,1	100,1

A2. Resultados obtidos nas Calibrações por Injecção Directa

Tabela A3. Valores obtidos na injeção directa de padrões de calibração.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)			Área _{média} (mV.s)	CV (%)
α -Pino	10,1	73,99	73,75	77,27	75,00	2,6
	25,2	207,65	191,74	198,03	199,14	4,0
	50,4	404,18	382,99	392,08	393,08	2,7
	75,7	595,80	583,70	604,75	594,75	1,8
	100,9	816,14	816,74	812,23	815,04	0,3
*Hexanona	10,0	67,28	64,85	65,51	65,88	1,9
	25,0	162,89	153,94	159,75	158,86	2,9
	50,1	313,64	295,81	317,64	309,03	3,8
	75,1	471,06	467,29	470,39	469,58	0,43
	100,2	633,62	641,09	638,87	637,86	0,60
Linalol	10,4	88,48	85,88	81,69	85,35	4,0
	25,9	181,51	185,23	183,19	183,31	1,0
	51,8	401,52	415,43	384,62	400,52	3,9
	77,7	596,79	585,32	609,84	597,32	2,1
	103,6	788,20	832,65	795,42	805,42	3,0
Borneol	10,0	67,09	68,91	65,26	67,09	2,7
	24,9	170,58	166,99	169,97	169,18	1,1
	49,8	376,83	342,28	376,83	365,31	5,5
	74,8	519,46	539,08	582,35	546,96	5,9
	99,7	730,22	776,94	693,58	733,58	5,7
α -Terpineol	10,1	60,14	67,74	64,28	64,05	5,9
	25,3	166,75	163,32	166,57	165,55	1,2
	50,5	336,78	303,21	329,97	323,32	5,5
	75,8	496,66	510,02	495,83	500,83	1,6
	101,0	664,73	695,85	630,95	663,84	4,9
Citronelol	10,0	64,35	63,16	71,55	66,35	6,8
	25,0	156,37	159,42	159,53	158,44	1,1
	50,0	330,59	309,48	355,03	331,70	6,9
	75,1	479,93	488,42	530,18	499,51	5,4
	100,1	653,26	681,95	633,30	656,17	3,7
Geraniol	9,9	58,75	60,07	56,71	58,51	2,9
	24,8	146,12	147,80	149,24	147,72	1,1
	49,6	313,46	290,29	337,10	313,62	7,5
	74,3	455,90	456,42	468,16	460,16	1,5
	99,1	615,31	645,85	588,94	616,70	4,6

*2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela A3. Valores obtidos na injeção directa de padrões de calibração. (continuação).

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)			Área _{média} (mV.s)	CV (%)
Acetato de Bornilo	10,0	65,85	64,52	61,62	64,00	3,4
	25,0	154,75	151,02	161,15	155,64	3,3
	50,0	326,55	302,42	353,51	327,49	7,8
	75,1	484,93	485,93	480,29	483,72	0,6
	100,1	638,58	669,52	639,05	649,05	2,7
Eugenol	10,1	57,81	56,67	53,27	55,92	4,2
	25,1	135,77	143,06	137,92	138,92	2,7
	50,3	275,49	298,30	271,71	281,83	5,1
	75,4	404,27	417,58	417,94	413,26	1,9
	100,6	575,93	583,24	538,94	566,04	4,2
Acetato de Geranilo	10,0	54,57	52,99	57,51	55,02	4,2
	25,0	144,49	145,32	146,65	145,49	0,8
	50,0	274,67	285,75	286,65	282,36	2,4
	75,1	415,74	418,31	413,08	415,71	0,6
	100,1	565,08	586,03	589,12	580,08	2,3

A3. Dados relativos ao estudo de linearidade – Calibração por Injeção Directa

Para o estudo da linearidade, foram determinados os parâmetros indicados de seguida (Miller e Miller, 2000):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc.})^2}{(n-2)}}$$

sendo:

- . $S_{y/x}$ - parâmetro estatístico;
- . y_i - valores de áreas obtidos experimentalmente;
- . $y_{calc.}$ - valores de áreas calculados, para cada valor de x, com base no ajuste linear;
- . n - número de pontos experimentais;

O desvio padrão para o declive (b) foi determinada da seguinte forma:

$$s_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2}}$$

sendo:

. x_i - valor da concentração do padrão;

. $x_{\text{médio}}$ - valor médio da concentração;

O valor do desvio padrão da ordenada na origem (a) foi calculado por:

$$s_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \cdot \sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2}}$$

Os intervalos de confiança para o declive (b) e a ordenada na origem (a) foram determinados de acordo com:

$$IC(b) = t.s_b \quad \text{e} \quad IC(a) = t.s_a$$

Os limites de detecção do método foram calculados com base na seguinte expressão:

$$LD = a + 3 \times s_a$$

Para o cálculo destes valores, optou-se por utilizar um nível de confiança de 95%.

Apresentam-se nas tabelas seguintes os resultados do estudo de linearidade.

Tabela A4. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para o α -Pineno. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{cal}	$(y_i - y_{\text{cal}})^2$	$(x_i - x_{\text{med}})^2$
10,1	102,0	75,00	72,82	4,77	1794,4
25,2	635,0	199,14	194,95	17,59	743,1
50,4	2540,2	393,08	398,76	32,24	4,2
75,7	5730,5	594,75	603,38	74,51	540,1
100,9	10180,8	815,04	807,20	61,41	2346,4
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{\text{cal}})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{\text{med}})^2$
52,5	19188,5	415,4		190,52	5428,3

Tabela A5. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para 2,2,6-Trimetilciclohexanona. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	65,88	62,42	11,95	1112,9
25,0	625,0	158,86	157,18	2,83	337,1
50,1	2510,0	309,03	315,73	44,95	45,4
75,1	5640,0	469,58	473,66	16,64	1007,4
100,2	10040,0	637,86	632,22	31,85	3230,7
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
52,1	18915,1	328,24		108,23	5733,6

Tabela A6. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Linalol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,4	108,2	85,35	75,19	103,24	1202,0
25,9	670,8	183,31	196,10	163,71	367,5
51,8	2683,2	400,52	398,15	5,61	45,3
77,7	6037,3	597,31	600,20	8,28	1064,8
103,6	10733,0	805,42	802,24	10,10	3425,8
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
53,9	20233,0	414,38		290,93	6105,3

Tabela A7. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Borneol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	67,09	64,04	9,30	1133,9
24,9	620,0	169,18	175,28	37,26	352,5
49,8	2480,0	365,31	361,19	16,99	37,5
74,8	5595,1	546,96	547,84	0,77	968,8
99,7	9940,1	733,58	733,74	0,03	3138,9
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
51,8	18735,2	376,42		64,35	5631,7

Tabela A8. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para α -Terpineol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,1	102,0	64,05	63,03	1,04	1146,0
25,3	640,1	165,55	163,49	4,26	347,9
50,5	2550,3	323,32	330,03	45,07	42,9
75,8	5745,6	500,83	497,24	12,88	1014,3
101,0	10201,0	663,84	663,79	0,0027	3254,0
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
52,5	19239,0	343,5		63,25	5805,5

Tabela A9. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Citronelol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	66,35	64,72	2,67	1126,2
25,0	625,0	158,44	163,81	28,79	344,4
50,0	2500,0	331,70	328,96	7,53	41,5
75,1	5640,0	499,51	494,77	22,50	994,8
100,1	10020,0	656,17	659,92	14,04	3196,9
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
52,0	18885,2	342,43		75,53	5703,8

Tabela A10. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Geraniol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
9,9	98,0	58,51	58,26	0,063	1116,4
24,8	615,0	147,72	151,68	15,70	342,7
49,6	2460,2	313,62	307,18	41,50	39,5
74,3	5520,4	460,16	462,05	3,56	960,3
99,1	9820,8	616,70	617,54	0,71	3112,3
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
51,5	18514,5	319,34		61,53	5571,1

Tabela A11. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Acetato de Bornilo. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,2	64,00	62,38	2,64	1892,3
25,0	625,0	155,64	160,00	18,97	1122,3
50,0	2500,0	327,49	322,70	22,98	342,3
75,1	5640,0	483,72	486,05	5,41	42,3
100,1	10016,0	649,05	648,75	0,092	3203,6
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
52,0	18885,2	335,98		50,10	5708,9

Tabela A12. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Eugenol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,1	102,0	55,92	54,93	0,99	1101,7
25,1	630,0	138,92	138,91	0,00010	330,9
50,3	2530,1	281,83	280,01	3,32	49,1
75,4	5685,2	413,26	420,54	53,02	1031,0
100,6	10120,4	566,04	561,64	19,39	3284,3
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
52,3	19067,6	291,19		76,72	5797,0

Tabela A13. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Acetato de Geraniol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	55,02	54,69	0,11	1064,7
25,0	625,0	145,49	140,70	22,91	310,8
50,0	2500,0	282,36	284,05	2,87	54,3
75,1	5640,0	415,71	427,98	150,49	1054,3
100,1	10020,0	580,08	571,33	76,61	3302,8
x_{med}	Sum(x_i^2)	y_{med}		Sum($y_i - y_{col}$) ²	Sum($x_i - x_{med}$) ²
52,0	18885,2	295,73		252,98	5787,0

Tabela A14. Parâmetros de estudo de linearidade. (para nível de confiança de 95%, $n=5$ $t=3,182$)

Composto	$S_{y/x}$	s_b	s_a
α -Pineno	7,97	0,11	6,70
2,2,6-Trimetilciclohexanona	6,01	0,08	4,88
Linalol	9,85	0,13	8,02
Borneol	4,63	0,062	3,78
α -Terpineol	4,59	0,060	3,74
Citronelol	5,02	0,066	4,08
Geraniol	4,53	0,061	3,69
Acetato de bornilo	4,09	0,054	3,32
Eugenol	5,06	0,066	4,10
Acetato de geraniol	9,18	0,12	7,42

Com base nos valores acima calculados, foi possível estabelecer intervalos de confiança para o declive (b) e ordenada na origem (a), que se apresentam na tabela seguinte.

Tabela A15. Intervalos de confiança para declive e ordenada na origem. (para nível de confiança de 95%)

Composto	$IC_{declive}$	$IC_{ordenada\ na\ origem}$
α -Pineno	0,344	21,322
2,2,6-Trimetilciclohexanona	0,252	15,527
Linalol	0,401	25,514
Borneol	0,196	12,023
α -Terpineol	0,192	11,897
Citronelol	0,211	12,994
Geraniol	0,193	11,750
Acetato de bornilo	0,172	10,578
Eugenol	0,211	13,054
Acetato de geraniol	0,384	23,610

Tabela A16. Limites de detecção.

Composto	a (ordenada na origem)	s _a	L.D. (mv.s)	L.D. (mg/L)
α-Pineno	-8,735	6,70	11,36	2,5
2,2,6-Trimetilciclohexanona	-0,747	4,88	13,89	2,3
Linalol	-5,746	8,10	18,56	3,1
Borneol	-10,619	3,78	0,71	1,5
α-Terpineol	-3,721	3,74	7,49	1,7
Citronelol	-1,534	4,12	10,83	1,9
Geraniol	-3,814	3,69	7,26	1,8
Acetato de bornilo	-2,704	3,32	7,27	1,5
Eugenol	-1,623	4,10	10,68	2,2
Acetato de geranilo	-2,646	7,42	19,61	3,9

A4. Ensaios de Precisão por Injecção Directa

Tabela A17. Ensaios de repetibilidade.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)							Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α-Pineno	50,4	421,35	435,62	410,30	403,89	418,40	430,23	419,97	12,69	3,0	
Hexanona*	50,1	330,85	321,65	307,50	338,40	300,50	314,20	318,85	11,76	3,7	
Linalol	51,8	418,50	428,47	401,23	425,30	410,90	415,70	416,68	13,78	3,3	
Borneol	49,8	385,40	395,40	364,10	380,56	354,60	344,70	370,79	15,99	4,3	
α-Terpineol	50,5	310,40	325,25	343,30	317,80	330,10	340,20	327,84	16,48	5,0	
Citronelol	50,0	330,10	324,80	338,63	317,45	340,58	337,20	331,46	6,98	2,1	
Geraniol	49,6	294,67	314,23	302,85	320,74	317,65	298,60	308,12	9,82	3,2	
Ac.Bornilo	50,0	338,70	310,30	330,33	304,80	307,85	336,91	321,48	14,59	4,5	
Eugenol	50,3	264,78	284,60	270,12	280,32	268,95	259,40	271,36	10,26	3,8	
Ac. Geranilo	50,0	294,63	310,47	299,60	294,30	314,80	313,23	304,51	8,10	2,7	

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela A18. Ensaios de precisão intermédia para o α -Pineno e 2,2,6-Trimetilciclohexanona.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)
α -Pineno	50,4	404,18	*Hexanona	50,1	313,64
		382,99			295,81
		392,08			317,64
		416,59			324,15
		390,47			312,87
		405,23			340,96
		421,35			330,85
		435,62			321,65
		410,30			307,50
		403,89			338,40
		418,40			300,50
		430,23			314,20
Área média (mV.s)		409,28	Área média (mV.s)		318,18
Desvio Padrão		16,03	Desvio Padrão		13,91
CV %		3,9	CV %		4,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela A19. Ensaios de precisão intermédia para o Linalol e Borneol.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)
Linalol	51,8	401,52	Borneol	49,8	376,83
		415,43			342,28
		384,62			376,83
		440,58			395,62
		427,30			375,20
		414,96			358,20
		418,50			385,40
		428,47			395,40
		401,23			364,10
		425,30			380,56
		410,90			354,60
		415,70			344,70
Área média (mV.s)		415,38	Área média (mV.s)		370,81
Desvio Padrão		14,82	Desvio Padrão		18,05
CV %		3,6	CV %		4,9

Tabela A20. Ensaios de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)
α -Terpineol	50,5	336,78	Citronelol	50,0	330,59
		303,21			309,48
		329,97			355,03
		341,28			310,14
		310,50			328,47
		320,80			347,60
		310,40			330,10
		325,25			324,80
		343,30			338,63
		317,80			317,45
		330,10			340,58
		340,20			337,20
Área média (mV.s)		325,80	Área média (mV.s)		330,84
Desvio Padrão		13,42	Desvio Padrão		14,04
CV %		4,1	CV %		4,2

Tabela A21. Ensaios de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)
Geraniol	49,6	313,46	Acetato de bornilo	50,0	326,55
		290,29			302,42
		337,10			353,51
		294,38			335,63
		321,30			300,23
		300,50			320,80
		294,67			338,70
		314,23			310,30
		302,85			330,33
		320,74			304,80
		317,65			307,85
		298,60			336,91
Área média (mV.s)		308,81	Área média (mV.s)		322,34
Desvio Padrão		14,10	Desvio Padrão		17,22
CV %		4,6	CV %		5,3

Tabela A22. Ensaios de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geranilo.

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)
Eugenol	50,3	275,49	Acetato de geranilo	50,0	274,67
		298,30			285,75
		271,71			286,65
		264,80			253,80
		300,87			274,20
		284,30			264,30
		264,78			294,63
		284,60			310,47
		270,12			299,60
		280,32			294,30
		268,95			314,80
		259,40			313,23
Área média (mV.s)		276,97	Área média (mV.s)		288,87
Desvio Padrão		13,13	Desvio Padrão		19,48
CV %		4,7	CV %		6,7

ANEXO B

Resultados obtidos no Estudo de Optimização das Condições de Extracção por
SPME

Lista de Tabelas

B1. Preparação dos Padrões Analíticos para Optimização das Condições de Extracção por SPME.....	119
Tabela B1. Concentrações das soluções padrão mãe.....	119
Tabela B2. Concentrações das soluções padrão intermédia e de optimização.....	119
B2. Resultados da Optimização das Condições de Extracção por SPME.....	120
Tabela B3. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA..... (40°C, sal a 20%, 60 minutos)	120
Tabela B4. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PDMS..... (40°C, sal a 20%, 60 minutos)	120
Tabela B5. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA a 40°C..... (sal a 20%, 60 minutos)	120
Tabela B6. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA a 50°C..... (sal a 20%, 60 minutos)	121
Tabela B7. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA a 60°C..... (sal a 20%, 60 minutos)	121
Tabela B8. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA sem sal..... (40°C, 60 minutos)	121
Tabela B9. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA sal a 10%..... (40°C, 60 minutos)	122
Tabela B10. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA sal a 20%..... (40°C, 60 minutos)	122
Tabela B11. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA sal a 30%..... (40°C, 60 minutos)	122
Tabela B12. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA para um..... tempo de extracção de 30 minutos (sal a 20%, 40°C)	123
Tabela B13. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA..... para um tempo de extracção de 60 minutos (sal a 20%, 40°C)	123
Tabela B14. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA para um..... tempo de extracção de 120 minutos (sal a 20%, 40°C)	123
Tabela B15. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA para um..... tempo de extracção de 180 minutos (sal a 20%, 40°C)	124

B1. Preparação dos Padrões Analíticos para Optimização das Condições de Extracção por SPME

As soluções mãe utilizadas foram preparadas do seguinte modo:

1. Solução mãe de ~2500 mg/L: Pesaram-se rigorosamente ~125,0 mg de composto e diluíram-se em etanol, para balão volumétrico de 50 mL.

Tabela B1. Concentrações das soluções padrão mãe.

Composto	Massa (mg)	Conc. (mg/L)
α -Pino	126,1	2522
2,2,6- Trimetilciclohexanona	125,2	2504
Linalol	127,84	2556,8
Borneol	124,6	2492
α -Terpineol	125,78	2515,6
Citronelol	125,1	2502
Geraniol	123,9	2478
Acetato de Bornilo	125,1	2502
Eugenol	125,7	2514
Acetato de Geraniol	125,1	2502

2. A partir da solução mãe foi preparada uma solução mistura padrão intermédia, em etanol. Os padrões usados para a optimização das condições de extracção foram preparados directamente para os vials por medição de 20 μ L da solução padrão intermédia e 2 mL de água extra-pura.

Tabela B2. Concentrações das soluções padrão intermédia e de optimização.

Composto	Vol. (μ L)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (μ g/L)
α -Pino	200	10,09	100,9
2,2,6- Trimetilciclohexanona	200	10,02	100,2
Linalol	200	10,23	102,3
Borneol	200	9,97	99,7
α -Terpineol	200	10,06	100,6
Citronelol	200	10,01	100,1
Geraniol	200	9,91	99,1
Acetato de Bornilo	200	10,01	100,1
Eugenol	200	10,06	100,6
Acetato de Geraniol	200	10,01	100,1

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 50 mL

B2. Resultados da Optimização das Condições de Extracção por SPME

Tabela B3. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA. (40°C, sal a 20%, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área _{média} (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	62,02	66,82	64,42	5,3
*Hexanona	100,2	169,47	150,29	159,88	8,5
Linalol	102,3	450,90	435,50	443,20	2,5
Borneol	99,7	211,75	194,98	203,37	5,8
α-Terpineol	100,6	182,87	171,88	177,37	4,4
Citronelol	100,1	516,33	496,81	506,57	2,7
Geraniol	99,1	249,50	224,67	237,09	7,4
Acetato de bornilo	100,1	758,66	801,58	780,12	3,9
Eugenol	100,6	94,64	101,41	98,02	4,9
Acetato de geraniol	100,1	722,18	778,86	750,52	5,3

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B4. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PDMS. (40°C, sal a 20%, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área _{média} (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	188,20	203,49	195,85	5,5
*Hexanona	100,2	214,98	200,46	207,72	4,9
Linalol	102,3	219,47	240,08	229,77	6,3
Borneol	99,7	86,25	82,19	84,22	3,4
α-Terpineol	100,6	73,48	79,24	76,36	5,3
Citronelol	100,1	309,52	324,08	316,80	3,2
Geraniol	99,1	120,15	132,35	126,25	6,8
Acetato de bornilo	100,1	991,86	950,70	971,28	3,0
Eugenol	100,6	43,28	41,54	42,41	2,9
Acetato de geraniol	100,1	800,45	784,44	792,44	1,4

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B5. Resultados obtidos na extracção dos compostos com a fibra de PA a 40°C. (sal a 20%, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área _{média} (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	67,83	62,12	64,97	6,2
*Hexanona	100,2	158,39	168,92	163,65	4,5
Linalol	102,3	456,17	430,15	443,16	4,2
Borneol	99,7	208,49	221,93	215,21	4,4
α-Terpineol	100,6	188,54	204,81	196,67	5,8
Citronelol	100,1	524,60	546,44	535,52	2,9
Geraniol	99,1	266,60	296,88	281,74	7,6
Acetato de bornilo	100,1	755,21	737,69	746,45	1,7
Eugenol	100,6	88,82	83,59	86,21	4,3
Acetato de geraniol	100,1	740,01	669,48	704,74	7,1

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B6. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA a 50°C. (sal a 20%, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	54,88	59,66	57,27	5,9
*Hexanona	100,2	139,03	128,03	133,53	5,8
Linalol	102,3	329,18	306,96	318,07	4,9
Borneol	99,7	176,04	186,35	181,19	4,0
α-Terpineol	100,6	147,21	158,06	152,63	5,0
Citronelol	100,1	434,26	473,69	453,97	6,1
Geraniol	99,1	256,71	230,60	243,65	7,6
Acetato de bornilo	100,1	703,59	740,05	721,82	3,6
Eugenol	100,6	110,46	124,90	117,68	8,7
Acetato de geraniol	100,1	779,71	695,34	737,52	8,1

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B7. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA a 60°C. (sal a 20%, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	56,74	49,85	53,29	9,1
*Hexanona	100,2	98,04	109,35	103,70	7,7
Linalol	102,3	181,27	171,35	176,31	4,0
Borneol	99,7	120,66	105,11	112,88	9,7
α-Terpineol	100,6	84,72	89,05	86,89	3,5
Citronelol	100,1	268,32	290,88	279,60	5,7
Geraniol	99,1	147,10	133,40	140,25	6,9
Acetato de bornilo	100,1	594,05	531,65	562,85	7,8
Eugenol	100,6	114,67	104,57	109,62	6,5
Acetato de geraniol	100,1	684,77	633,28	659,03	5,5

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B8. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA sem sal. (40°C, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	89,34	82,21	85,78	5,9
*Hexanona	100,2	30,17	28,49	29,33	4,1
Linalol	102,3	103,92	111,52	107,72	5,0
Borneol	99,7	51,09	54,30	52,69	4,3
α-Terpineol	100,6	42,49	38,43	40,46	7,1
Citronelol	100,1	135,82	145,82	140,82	5,0
Geraniol	99,1	54,76	60,60	57,68	7,2
Acetato de bornilo	100,1	368,44	344,52	356,48	4,7
Eugenol	100,6	28,75	30,39	29,57	3,9
Acetato de geraniol	100,1	443,41	421,16	432,28	3,6

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B9. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA sal a 10%. (40°C, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	80,01	84,06	82,04	3,5
*Hexanona	100,2	89,75	96,09	92,92	4,8
Linalol	102,3	236,22	219,08	227,65	5,3
Borneol	99,7	112,43	100,93	106,68	7,6
α-Terpineol	100,6	98,29	89,23	93,76	6,8
Citronelol	100,1	278,92	304,49	291,70	6,2
Geraniol	99,1	116,42	126,22	121,32	5,7
Acetato de bornilo	100,1	565,47	546,51	555,99	2,4
Eugenol	100,6	47,59	50,99	49,29	4,9
Acetato de geranilo	100,1	629,03	587,72	608,37	4,8

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B10. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA sal a 20%. (40°C, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	75,13	71,88	73,51	3,1
*Hexanona	100,2	147,02	137,19	142,11	4,9
Linalol	102,3	431,81	476,95	454,38	7,0
Borneol	99,7	196,30	208,63	202,47	4,3
α-Terpineol	100,6	188,14	205,75	196,94	6,3
Citronelol	100,1	560,88	504,08	532,48	7,5
Geraniol	99,1	258,51	240,04	249,27	5,2
Acetato de bornilo	100,1	705,70	741,28	723,49	3,5
Eugenol	100,6	87,64	79,70	83,67	6,7
Acetato de geranilo	100,1	729,19	647,75	688,47	8,4

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B11. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA sal a 30%. (40°C, 60 minutos)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	58,94	66,83	62,89	8,9
*Hexanona	100,2	183,78	208,39	196,09	8,9
Linalol	102,3	764,75	856,17	810,46	8,0
Borneol	99,7	352,32	397,49	374,91	8,5
α-Terpineol	100,6	424,85	368,54	396,70	10,0
Citronelol	100,1	847,40	724,60	786,00	11,0
Geraniol	99,1	447,93	496,60	472,26	7,3
Acetato de bornilo	100,1	823,05	742,21	782,63	7,3
Eugenol	100,6	118,84	138,82	128,83	11,0
Acetato de geranilo	100,1	509,20	610,01	559,61	12,7

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B12. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA para um tempo de extração de 30 minutos. (sal a 20%, 40°C)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	47,79	50,56	4,0
*Hexanona	100,2	152,33	139,65	6,1
Linalol	102,3	339,54	377,95	7,6
Borneol	99,7	165,69	154,39	5,0
α-Terpineol	100,6	152,20	146,67	2,6
Citronelol	100,1	370,91	410,87	7,2
Geraniol	99,1	184,16	199,53	5,7
Acetato de bornilo	100,1	512,78	598,37	10,9
Eugenol	100,6	66,95	72,78	5,9
Acetato de geraniol	100,1	566,04	507,05	7,8

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B13. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA para um tempo de extração de 60 minutos. (sal a 20%, 40°C)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	63,16	57,94	6,1
*Hexanona	100,2	145,52	134,78	5,4
Linalol	102,3	415,31	463,87	7,8
Borneol	99,7	209,33	230,41	6,8
α-Terpineol	100,6	184,78	205,36	7,5
Citronelol	100,1	523,82	571,66	6,2
Geraniol	99,1	263,24	294,74	8,0
Acetato de bornilo	100,1	736,23	775,71	3,7
Eugenol	100,6	85,33	94,05	6,9
Acetato de geraniol	100,1	682,21	744,91	6,2

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B14. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA para um tempo de extração de 120 minutos. (sal a 20%, 40°C)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	62,83	61,12	2,0
*Hexanona	100,2	172,39	184,83	4,9
Linalol	102,3	456,17	492,73	5,4
Borneol	99,7	263,49	275,92	3,3
α-Terpineol	100,6	218,54	238,72	6,2
Citronelol	100,1	624,60	690,01	7,0
Geraniol	99,1	356,60	381,45	4,8
Acetato de bornilo	100,1	845,21	855,78	0,9
Eugenol	100,6	128,82	124,96	2,2
Acetato de geraniol	100,1	854,01	926,01	5,7

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela B15. Resultados obtidos na extração dos compostos com a fibra de PA para um tempo de extração de 180 minutos. (sal a 20%, 40°C)

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	75,50	81,92	78,71	5,8
*Hexanona	100,2	178,66	185,88	182,27	2,8
Linalol	102,3	442,45	483,04	462,74	6,2
Borneol	99,7	276,21	296,91	286,56	5,1
α-Terpineol	100,6	230,05	243,73	236,89	4,1
Citronelol	100,1	658,13	717,31	687,72	6,1
Geraniol	99,1	403,41	411,35	407,38	1,4
Acetato de bornilo	100,1	882,15	843,10	862,62	3,2
Eugenol	100,6	167,06	178,78	172,92	4,8
Acetato de geranilo	100,1	940,91	1046,59	993,75	7,5
* 2,2,6-Trimetilciclohexanona					

ANEXO C

Resultados obtidos nas Calibrações após extracção por SPME

Lista de Tabelas

C1. Preparação dos Padrões Analíticos para Extração por SPME.....	127
Tabela C1. Concentrações das soluções padrão mãe.....	127
Tabela C2. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	127
1º nível de concentração	
Tabela C3. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	128
2º nível de concentração	
Tabela C4. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	128
3º nível de concentração	
Tabela C5. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	128
4º nível de concentração	
Tabela C6. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	129
5º nível de concentração	
Tabela C7. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o.....	129
6º nível de concentração	
C2. Resultados obtidos nas Calibrações após extração por SPME.....	130
Tabela C8. Valores obtidos na extração por SPME dos padrões de calibração.....	130
C3. Dados relativos ao estudo de linearidade – SPME.....	131
Tabela C9. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	131
de linearidade para α -Pino. (valores em mV.s)	
Tabela C10. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	132
de linearidade para 2,2,6-Trimetilciclohexanona. (valores em mV.s)	
Tabela C11. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	132
de linearidade para Linalol. (valores em mV.s)	
Tabela C12. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	132
de linearidade para Borneol. (valores em mV.s)	
Tabela C13. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	133
de linearidade para α -Terpineol. (valores em mV.s)	
Tabela C14. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	133
de linearidade para Citronelol. (valores em mV.s)	
Tabela C15. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	133
de linearidade para Geraniol. (valores em mV.s)	
Tabela C16. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	134
de linearidade para Acetato de bornilo (valores em mV.s)	
Tabela C17. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	134
de linearidade para Eugenol (valores em mV.s)	
Tabela C18. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros.....	134
de linearidade para Acetato de geraniol (valores em mV.s)	
Tabela C19. Parâmetros de estudos de linearidade.....	135
(para nível de confiança de 95%, $n=6$ $t=2,776$)	
Tabela C20. Intervalos de confiança para declive e ordenada na origem.....	135
(para nível de confiança de 95%)	
Tabela C21. Limites de detecção.....	135

C4. Ensaios de Precisão – SPME	135
Tabela C22. Ensaios de repetibilidade para o 1º nível de concentração.....	135
Tabela C23. Ensaios de repetibilidade para o 4º nível de concentração.....	135
Tabela C24. Ensaios de precisão intermédia para o α -Pino e 2,2,6-Trimetilciclohexanona.....	136
1º nível de concentração.	
Tabela C25. Ensaios de precisão intermédia para o α -Pino e 2,2,6-Trimetilciclohexanona.....	136
4º nível de concentração.	
Tabela C26. Ensaios de precisão intermédia para o Linalol e Borneol.....	137
1º nível de concentração.	
Tabela C27. Ensaios de precisão intermédia para o Linalol e Borneol.....	137
4º nível de concentração.	
Tabela C28. Ensaios de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol.....	138
1º nível de concentração.	
Tabela C29. Ensaios de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol.....	138
4º nível de concentração.	
Tabela C30. Ensaios de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo.....	139
1º nível de concentração.	
Tabela C31. Ensaios de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo.....	139
4º nível de concentração.	
Tabela C32. Ensaios de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geraniol.....	140
1º nível de concentração.	
Tabela C33. Ensaios de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geraniol.....	140
4º nível de concentração.	
C5. Ensaios de Exactidão – SPME	141
Tabela C34. 1º Ensaio de recuperação para o 1º nível de concentração.....	141
Tabela C35. 2º Ensaio de recuperação para o 1º nível de concentração.....	142
Tabela C36. 1º Ensaio de recuperação para o 2º nível de concentração.....	142
Tabela C37. 2º Ensaio de recuperação para o 2º nível de concentração.....	143
Tabela C38. 1º Ensaio de recuperação para o 3º nível de concentração.....	143
Tabela C39. 2º Ensaio de recuperação para o 3º nível de concentração.....	144
Tabela C40. 1º Ensaio de recuperação para o 4º nível de concentração.....	144
Tabela C41. 2º Ensaio de recuperação para o 4º nível de concentração.....	145
Tabela C42. Recuperação média.....	146
C6. Eficiência de Extração – SPME	148
Tabela C43. Eficiência de extração (%).....	148
Tabela C44. Eficiência média de extração (%).....	150

C1. Preparação dos Padrões Analíticos para Extração por SPME

As soluções mãe utilizadas foram preparadas do seguinte modo:

1. Solução mãe de ~2500 mg/L: Pesaram-se rigorosamente ~125,0 mg de composto e diluíram-se em etanol, para balão volumétrico de 50 mL.

Tabela C1. Concentrações das soluções padrão mãe

Composto	Massa (mg)	Conc. (mg/L)
α -Pineno	126,1	2522
2,2,6- Trimetilciclohexanona	125,2	2504
Linalol	127,84	2556,8
Borneol	124,6	2492
α -Terpineol	125,78	2515,6
Citronelol	125,1	2502
Geraniol	123,9	2478
Acetato de Bornilo	125,1	2502
Eugenol	125,7	2514
Acetato de Geranilo	125,1	2502

2. A partir da solução mãe foram preparados as misturas padrão intermédias, em etanol. Os padrões para a calibração foram preparados directamente para os vials por medição de 20 μ L da solução padrão intermédia e 2 mL de água extra-pura.

Tabela C2. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 1º nível de concentração.

Composto	Vol (μ L)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (μ g/L)
α -Pineno	200	10,09	100,9
2,2,6- Trimetilciclohexanona	50	2,50	25,0
Linalol	30	1,53	15,3
Borneol	50	2,49	24,9
α -Terpineol	50	2,52	25,2
Citronelol	20	1,00	10,0
Geraniol	20	0,99	9,9
Acetato de Bornilo	20	1,00	10,0
Eugenol	100	5,03	50,3
Acetato de Geranilo	20	1,00	10,0

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 50 mL

Tabela C3. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 2º nível de concentração.

Composto	Vol (µL)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (µg/L)
α-Pineno	560	28,25	282,5
2,2,6- Trimetilciclohexanona	150	7,51	75,1
Linalol	90	4,60	46,0
Borneol	150	7,48	74,8
α-Terpineol	150	7,55	75,5
Citronelol	60	3,00	30,0
Geraniol	60	2,97	29,7
Acetato de Bornilo	60	3,00	30,0
Eugenol	300	15,08	150,8
Acetato de Geranilo	60	3,00	30,0

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 50 mL

Tabela C4. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 3º nível de concentração.

Composto	Vol (µL)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (µg/L)
α-Pineno	920	46,40	464,0
2,2,6- Trimetilciclohexanona	250	12,52	125,2
Linalol	150	7,67	76,7
Borneol	250	12,46	124,6
α-Terpineol	250	12,58	125,8
Citronelol	100	5,00	50,0
Geraniol	100	4,96	49,6
Acetato de Bornilo	100	5,00	50,0
Eugenol	500	25,14	251,4
Acetato de Geranilo	100	5,00	50,0

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 50 mL

Tabela C5. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 4º nível de concentração.

Composto	Vol (µL)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (µg/L)
α-Pineno	640	64,56	645,6
2,2,6- Trimetilciclohexanona	175	17,53	175,3
Linalol	105	10,74	107,4
Borneol	175	17,44	174,4
α-Terpineol	175	17,61	176,1
Citronelol	70	7,01	70,1
Geraniol	70	6,94	69,4
Acetato de Bornilo	70	7,01	70,1
Eugenol	350	35,20	352,0
Acetato de Geranilo	70	7,01	70,1

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 25 mL

Tabela C6. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 5º nível de concentração.

Composto	Vol (µL)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (µg/L)
α-Pineno	820	82,72	827,2
2,2,6- Trimetilciclohexanona	225	22,54	225,4
Linalol	135	13,81	138,1
Borneol	225	22,43	224,3
α-Terpineol	225	22,64	226,4
Citronelol	90	9,01	90,1
Geraniol	90	8,92	89,2
Acetato de Bornilo	90	9,01	90,1
Eugenol	450	45,25	452,5
Acetato de Geranilo	90	9,01	90,1

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 25 mL

Tabela C7. Concentrações das soluções padrão intermédia e de calibração para o 6º nível de concentração.

Composto	Vol (µL)*	Conc. (mg/L)	Conc. Vial (µg/L)
α-Pineno	200	100,88	1008,8
2,2,6- Trimetilciclohexanona	50	25,04	250,4
Linalol	30	15,34	153,4
Borneol	50	24,92	249,2
α-Terpineol	50	25,16	251,6
Citronelol	20	10,01	100,1
Geraniol	20	9,91	99,1
Acetato de Bornilo	20	10,01	100,1
Eugenol	100	50,28	502,8
Acetato de Geranilo	20	10,01	100,1

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 25 mL

C2. Resultados obtidos nas Calibrações após extracção por SPME

Tabela C8. Valores obtidos na extracção por SPME dos padrões de calibração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)		Área média (mV.s)	CV (%)
α-Pineno	100,9	69,12	62,83	65,98	6,7
	282,5	223,85	215,33	219,59	2,7
	464,0	311,90	340,97	326,44	6,3
	645,6	478,21	498,47	488,34	2,9
	827,2	630,42	613,56	621,99	1,9
	1008,8	714,72	785,02	749,87	6,6
*Hexanona	25,0	30,31	32,34	31,33	4,6
	75,1	108,46	113,04	110,75	2,9
	125,2	171,57	160,41	165,99	4,7
	175,3	235,13	231,63	233,38	1,1
	225,4	287,33	305,00	296,16	4,2
	250,4	341,26	365,56	353,41	4,9
Linalol	15,3	60,30	55,92	58,11	5,3
	46,0	181,05	200,29	190,67	7,1
	76,7	297,62	287,07	292,35	2,5
	107,4	408,71	425,49	417,10	2,8
	138,1	558,49	546,59	552,54	1,5
	153,4	619,79	639,35	629,57	2,2
Borneol	24,9	51,24	49,08	50,16	3,0
	74,8	159,36	151,15	155,26	3,7
	124,6	264,27	274,85	269,56	2,8
	174,4	379,37	371,23	375,30	1,5
	224,3	466,91	492,03	479,47	3,7
	249,2	546,26	533,44	539,85	1,7
α-Terpineol	25,2	42,42	46,58	44,50	6,6
	75,5	133,21	135,87	134,54	1,4
	125,8	225,95	233,55	229,74	2,3
	176,1	343,67	328,52	336,10	3,2
	226,4	433,36	421,72	427,54	1,9
	251,6	481,86	468,26	475,06	2,0
Citronelol	10,0	42,66	46,60	44,63	6,2
	30,0	151,72	143,94	147,83	3,7
	50,0	266,07	274,42	270,25	2,2
	70,1	362,10	370,67	366,39	1,7
	90,1	484,59	472,55	478,57	1,8
	100,1	540,23	510,64	525,44	4,0

* 2,2,6-Trimetilciclohexanona

Tabela C8. Valores obtidos na extração por SPME dos padrões de calibração. (continuação)

Composto	Conc. (mg/L)	Área (mV.s)		Área _{médio} (mV.s)	CV (%)
Geraniol	9,9	27,16	24,82	25,99	6,4
	29,7	72,89	75,71	74,30	2,7
	49,6	127,97	121,38	124,68	3,7
	69,4	180,18	178,96	179,57	0,5
	89,2	234,42	227,06	230,74	2,3
	99,1	258,45	275,20	266,83	4,4
Acetato de Bornilo	10,0	75,95	68,54	72,25	7,3
	30,0	219,19	211,81	215,50	2,4
	50,0	362,72	354,00	358,36	1,7
	70,1	475,81	516,51	496,16	5,8
	90,1	627,81	662,34	645,08	3,8
	100,1	709,52	771,68	740,60	5,9
Eugenol	50,3	37,46	36,26	36,86	2,3
	150,8	129,77	119,71	124,74	5,7
	251,4	185,30	193,38	189,34	3,0
	352,0	282,78	272,41	277,59	2,6
	452,5	357,25	344,56	350,91	2,7
	502,8	421,43	390,51	405,97	5,4
Acetato de Geraniol	10,0	63,23	65,62	64,43	2,6
	30,0	228,11	207,02	217,57	6,9
	50,0	350,54	320,80	335,67	6,3
	70,1	475,09	497,48	486,28	3,3
	90,1	629,73	619,57	624,65	1,1
	100,1	718,85	692,56	705,71	2,6

C3. Dados relativos ao estudo de linearidade – SPME

Para o estudo da linearidade, foram determinados os parâmetros já apresentados na secção A3 do anexo A. Encontram-se nas tabelas seguintes os resultados do estudo de linearidade.

Tabela C9. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para α -Pino. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
100,9	10180,8	65,98	70,05	16,59	206055,5
282,5	79806,3	219,59	206,98	159,01	74165,4
464,0	215296,0	326,44	343,83	302,45	8250,7
645,6	416799,4	488,34	480,76	57,50	8238,6
827,2	684259,8	621,99	617,68	18,54	74183,6
1008,8	1017677,4	749,87	754,61	22,49	206085,7
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
554,8	2424019,7	412,04		576,56	576979,5

Tabela C10. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para 2,2,6-Trimetilciclohexanona. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
25,0	625,0	31,33	33,32	3,94	14657,1
75,1	5640,0	110,75	101,70	81,86	5036,3
125,2	15675,0	165,99	170,09	16,80	435,4
175,3	30730,1	233,38	238,48	25,96	854,6
225,4	50805,2	296,16	306,86	114,53	6293,8
250,4	62700,2	353,41	340,99	154,33	10885,4
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
146,1	166175,5	198,50		397,43	38162,6

Tabela C11. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Linalol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
15,3	234,1	58,11	55,19	8,52	5503,17
46,0	2116,0	190,67	179,99	114,13	1890,80
76,7	5882,9	292,35	304,78	154,57	163,41
107,4	11534,8	417,10	429,58	155,70	321,01
138,1	19071,6	552,54	554,37	3,36	2363,58
153,4	23531,6	629,57	616,57	169,05	4085,34
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{col})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
89,5	62370,9	356,72		605,33	14327,31

Tabela C12. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Borneol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
24,9	621,0	50,16	49,53	0,40	14507,4
74,8	5589,1	155,26	157,98	7,39	4985,3
124,6	15525,2	269,56	266,43	9,80	431,3
174,4	30429,3	375,30	374,88	0,18	845,3
224,3	50301,5	479,47	483,33	14,92	6227,3
249,2	62100,6	539,85	537,56	5,25	10781,4
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
145,4	164566,7	311,60		37,94	37777,9

Tabela C13. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para α -Terpineol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
25,2	635,0	44,50	41,20	10,92	14778,5
75,5	5700,3	134,54	137,77	10,44	5078,9
125,8	15825,6	229,74	234,35	21,22	439,6
176,1	31011,2	336,10	330,92	26,80	860,4
226,4	51257,0	427,54	427,50	0,001681	6341,5
251,6	63302,6	475,06	475,88	0,6773	10990,0
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
146,7	167731,7	274,58		70,07	38488,9

Tabela C14. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Citronelol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	44,63	45,61	0,9624	2340,9
30,0	900,0	147,83	153,05	27,26	805,6
50,0	2500,0	270,25	260,49	95,24	70,3
70,1	4914,0	366,39	368,47	4,319	137,3
90,1	8118,0	478,57	475,91	7,085	1005,9
100,1	10020,0	525,44	529,63	17,54	1740,3
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
58,4	26552,0	305,52		152,40	6100,3

Tabela C15. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Geraniol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{col}	$(y_i - y_{col})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
9,9	98,0	25,99	22,27	13,86	2296,0
29,7	882,1	74,30	75,19	0,7958	790,5
49,6	2460,2	124,68	128,38	13,73	67,5
69,4	4816,4	179,57	181,31	3,03	134,2
89,2	7956,6	230,74	234,24	12,22	984,9
99,1	9820,8	266,83	260,70	37,60	1704,3
x_{med}	$Sum(x_i^2)$	y_{med}		$Sum(y_i - y_{col})^2$	$Sum(x_i - x_{med})^2$
57,8	26034,1	150,35		81,23	5977,5

Tabela C16. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Acetato de bornilo. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{cal}	$(y_i - y_{cal})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	72,25	67,97	18,31	2340,9
30,0	900,0	215,50	214,03	2,158	805,6
50,0	2500,0	358,36	360,09	2,996	70,3
70,1	4914,0	496,16	506,88	114,95	137,3
90,1	8118,0	645,08	652,94	61,80	1005,9
100,1	10020,0	740,60	725,97	214,00	1740,3
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{cal})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
58,4	26552,0	421,32		414,21	6100,3

Tabela C17. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Eugenol. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{cal}	$(y_i - y_{cal})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
50,3	2530,1	36,86	37,28	0,1790	59049,0
150,8	22740,6	124,74	117,38	54,15	20306,3
251,4	63202,0	189,34	197,56	67,57	1755,6
352,0	123904,0	277,59	277,74	0,021904	3445,7
452,5	204756,3	350,91	357,84	47,98	25344,6
502,8	252807,8	405,97	397,93	64,71	43890,3
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{cal})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
293,3	669940,8	230,90		234,60	153791,4

Tabela C18. Cálculos dos valores médios necessários para a determinação de parâmetros de linearidade para Acetato de geranilo. (valores em mV.s)

x_i	x_i^2	y_i	y_{cal}	$(y_i - y_{cal})^2$	$(x_i - x_{med})^2$
10,0	100,0	64,43	65,92	2,232	2340,9
30,0	900,0	217,57	206,38	125,13	805,6
50,0	2500,0	335,67	346,84	124,86	70,3
70,1	4914,0	486,28	488,01	2,980	137,3
90,1	8118,0	624,65	628,47	14,56	1005,9
100,1	10020,0	705,71	698,70	49,19	1740,3
x_{med}	$\text{Sum}(x_i^2)$	y_{med}		$\text{Sum}(y_i - y_{cal})^2$	$\text{Sum}(x_i - x_{med})^2$
58,4	26552,0	405,72		318,95	6100,3

Tabela C19. Parâmetros de estudos de linearidade. (para nível de confiança de 95%, $n=6$ $t=2,776$)

Composto	$S_{y/x}$	s_b	s_a
α -Pineno	12,01	0,016	10,05
2,2,6-Trimetilciclohexanona	9,97	0,051	8,49
Linalol	12,30	0,10	10,48
Borneol	3,08	0,016	2,62
α -Terpineol	4,19	0,021	3,57
Citronelol	6,17	0,079	5,26
Geraniol	4,51	0,058	3,84
Acetato de bornilo	10,18	0,13	8,67
Eugenol	7,66	0,020	6,53
Acetato de geraniol	8,93	0,11	7,61

Na tabela seguinte apresentam-se os intervalos de confiança para o declive (b) e ordenada na origem (a) calculados com base nos parâmetros de linearidade.

Tabela C20. Intervalos de confiança para declive e ordenada na origem. (para nível de confiança de 95 %)

Composto	IC _{declive}	IC _{ordenada na origem}
α -Pineno	0,044	27,893
2,2,6-Trimetilciclohexanona	0,142	23,577
Linalol	0,285	29,093
Borneol	0,044	7,286
α -Terpineol	0,059	9,903
Citronelol	0,219	14,597
Geraniol	0,162	10,660
Acetato de bornilo	0,362	24,064
Eugenol	0,054	18,118
Acetato de geraniol	0,317	21,116

Tabela C21. Limites de detecção.

Composto	a (ordenada na origem)	s_a	L.D. (mv.s)	L.D. ($\mu\text{g/L}$)
α -Pineno	-6,025	10,05	24,11	40,0
2,2,6-Trimetilciclohexanona	-0,809	8,49	24,67	18,7
Linalol	-7,003	10,48	24,43	7,7
Borneol	-4,700	2,62	3,17	3,6
α -Terpineol	-7,189	3,57	3,51	5,6
Citronelol	-8,109	5,26	7,66	2,9
Geraniol	-4,196	3,84	7,32	4,3
Acetato de bornilo	-5,059	8,67	20,94	3,6
Eugenol	-2,806	6,53	16,77	24,6
Acetato de geraniol	-4,306	7,61	18,51	3,2

C4. Ensaios de Precisão – SPME

Tabela C22. Ensaios de repetibilidade para o 1º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)		Área (mV.s)					Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α-Pineno	100,9	66,23	63,14	68,45	60,89	65,47	63,25	64,57	2,68	4,2
*Hexanona	25,0	28,21	32,47	26,10	30,37	32,68	29,43	29,88	2,53	8,5
Linalol	15,3	57,28	60,38	54,50	56,95	52,15	51,57	55,47	3,37	6,1
Borneol	24,9	47,25	45,16	49,58	47,89	46,37	45,78	47,01	1,60	3,4
α-Terpineol	25,2	42,25	45,58	45,21	43,87	41,68	40,54	43,19	2,02	4,7
Citronelol	10,0	42,85	45,74	46,69	45,87	45,67	42,60	44,90	1,73	3,8
Geraniol	9,9	27,51	23,85	24,56	24,76	23,21	24,65	24,76	1,47	5,9
Bornilo	10,0	67,39	68,20	70,45	70,94	73,25	71,66	70,32	2,18	3,1
Eugenol	50,3	36,12	35,58	35,37	37,95	34,22	32,82	35,34	1,74	4,9
Geranilo	10,0	65,27	59,14	64,85	57,15	63,60	60,21	61,70	3,34	5,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C23. Ensaios de repetibilidade para o 4º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)							Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α-Pineno	645,6	488,34	444,43	488,26	433,71	486,56	418,01	459,89	31,64	6,9	
*Hexanona	175,3	265,75	284,27	275,43	273,43	249,77	245,03	265,61	15,36	5,8	
Linalol	107,4	407,10	390,53	419,79	394,41	386,73	392,46	398,50	12,51	3,1	
Borneol	174,4	385,30	365,79	390,07	358,90	371,05	355,00	371,02	14,13	3,8	
α-Terpineol	176,1	336,10	348,10	353,14	341,14	387,35	361,09	354,49	18,34	5,2	
Citronelol	70,1	366,39	377,82	334,82	357,07	344,97	358,74	356,63	15,23	4,3	
Geraniol	69,4	179,57	169,18	178,51	177,30	166,88	168,15	173,26	5,78	3,3	
Bornilo	70,1	491,16	463,24	498,50	459,54	486,68	482,01	480,19	15,58	3,2	
Eugenol	352,0	277,59	268,16	263,24	265,15	268,90	234,73	262,96	14,69	5,6	
Geranilo	70,1	486,28	448,68	509,84	477,69	481,86	465,52	478,31	20,55	4,3	

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C24. Ensaios de precisão intermédia para o α -Pineno e 2,2,6-Trimetilciclohexanona – 1º nível de concentração.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área (mV.s)	Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área (mV.s)
α -Pineno	100,9	66,23	*Hexanona	25,0	28,21
		63,14			32,47
		68,45			26,10
		60,89			30,37
		65,47			32,68
		63,25			29,43
		69,45			33,25
		73,87			30,42
		69,11			29,41
		56,50			27,51
		58,01			26,23
Área média (mV.s)		64,94	Área média (mV.s)		29,64
Desvio Padrão		5,23	Desvio Padrão		2,50
CV %		8,05	CV %		8,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C25. Ensaios de precisão intermédia para o α -Pineno e 2,2,6-Trimetilciclohexanona – 4º nível de concentração.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área (mV.s)	Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área (mV.s)
α -Pineno	645,6	488,34	*Hexanona	175,3	265,75
		444,43			284,27
		488,26			275,43
		433,71			273,43
		486,56			249,77
		418,01			245,03
		515,23			265,23
		496,50			296,00
		425,58			225,69
		450,74			247,28
		416,89			256,90
		470,90			274,57
		512,58			311,50
		435,21			247,51
		505,63			207,40
		417,23			277,00
		560,40			255,40
		495,56			290,10
		498,20			295,20
		525,30			275,30
		514,20			304,20
Área média (mV.s)		476,16	Área média (mV.s)		267,76
Desvio Padrão		41,61	Desvio Padrão		25,19
CV %		8,7	CV %		9,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C26. Ensaios de precisão intermédia para o Linalol e Borneol – 1º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L))	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L))	Área (mV.s)
Linalol	15,3	57,28	Borneol	24,9	47,25
		60,38			45,16
		54,50			49,58
		56,95			47,89
		52,15			46,37
		51,57			45,78
		64,52			48,51
		65,67			47,23
		64,48			47,05
		53,50			45,05
		55,50			43,07
Área média (mV.s)		57,86	Área média (mV.s)		46,63
Desvio Padrão		5,15	Desvio Padrão		1,81
CV %		8,9	CV %		3,9

Tabela C27. Ensaios de precisão intermédia para o Linalol e Borneol – 4º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
Linalol	107,4	407,10	Borneol	174,4	385,30
		390,53			365,79
		419,79			390,07
		394,41			358,90
		386,73			371,05
		392,46			355,00
		348,60			336,61
		376,60			366,30
		420,18			364,80
		390,24			330,60
		456,40			391,40
		370,34			345,87
		342,50			339,00
		423,71			380,51
		405,28			395,41
		375,83			335,32
		360,29			342,29
		395,60			350,14
		390,20			342,00
		385,40			361,70
		373,80			315,40
Área média (mV.s)		390,76	Área média (mV.s)		358,26
Desvio Padrão		28,16	Desvio Padrão		20,99
CV %		7,2	CV %		5,9

Tabela C28. Ensaios de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol – 1º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
α-Terpineol	25,2	42,25	Citronelol	10,0	42,85
		45,58			45,74
		45,21			46,69
		43,87			45,87
		41,68			45,67
		40,54			42,60
		46,47			46,95
		45,20			47,01
		45,97			46,52
		38,08			39,07
		39,10			40,20
Área média (mV.s)		43,09	Área média (mV.s)		44,47
Desvio Padrão		2,93	Desvio Padrão		2,83
CV %		6,8	CV %		6,4

Tabela C29. Ensaios de precisão intermédia para o α -Terpineol e Citronelol – 4º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
α-Terpineol	176,1	336,10	Citronelol	70,1	366,39
		348,10			377,82
		353,14			334,82
		341,14			357,07
		387,35			344,97
		361,09			358,74
		300,25			315,80
		326,48			337,10
		349,20			378,60
		312,50			349,40
		368,70			374,60
		314,60			324,50
		320,50			368,10
		348,70			357,60
		368,90			384,30
		304,80			315,40
		288,70			301,30
		314,00			335,32
		324,60			334,60
		338,40			346,20
		285,60			335,60
Área média (mV.s)		332,99	Área média (mV.s)		347,53
Desvio Padrão		27,15	Desvio Padrão		24,45
CV %		8,2	CV %		7,0

Tabela C30. Ensaios de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo – 1º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
Geraniol	9,9	27,51	Acetato de bornilo	10,0	67,39
		23,85			68,20
		24,56			70,45
		24,76			70,94
		23,21			73,25
		24,65			71,66
		20,45			73,45
		20,84			75,20
		21,03			77,62
		24,46			66,17
		24,83			66,05
Área média (mV.s)		23,65	Área média (mV.s)		70,94
Desvio Padrão		2,13	Desvio Padrão		3,77
CV %		9,0	CV %		5,3

Tabela C31. Ensaios de precisão intermédia para o Geraniol e Acetato de bornilo – 4º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
Geraniol	69,4	179,57	Acetato de bornilo	70,1	491,16
		169,18			463,24
		178,51			498,50
		177,30			459,54
		166,88			486,68
		168,15			482,01
		170,60			525,60
		189,40			510,70
		201,40			445,30
		184,60			464,21
		164,28			434,00
		145,90			484,70
		160,56			524,30
		159,10			449,80
		164,00			509,64
		143,47			443,47
		163,90			563,90
		154,70			524,70
		174,38			501,49
		192,70			534,90
		158,64			520,40
Área média (mV.s)		169,87	Área média (mV.s)		491,34
Desvio Padrão		14,59	Desvio Padrão		35,26
CV %		8,6	CV %		7,2

Tabela C32. Ensaios de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geranilo – 1º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
Eugenol	50,3	36,12	Acetato de geranilo	10,0	65,27
		35,58			59,14
		35,37			64,85
		37,95			57,15
		34,22			63,60
		32,82			60,21
		35,48			67,46
		32,23			68,37
		34,59			65,93
		29,88			55,40
		31,94			54,06
Área média (mV.s)		34,20	Área média (mV.s)		61,95
Desvio Padrão		2,29	Desvio Padrão		4,99
CV %		6,7	CV %		8,0

Tabela C33. Ensaios de precisão intermédia para o Eugenol e Acetato de geranilo – 4º nível de concentração.

Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Composto	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)
Eugenol	352,0	277,59	Acetato de geranilo	70,1	486,28
		268,16			468,68
		263,24			509,84
		265,15			477,69
		268,90			481,86
		234,73			465,52
		258,47			509,63
		221,00			480,56
		278,29			417,24
		289,52			442,41
		239,65			405,21
		286,54			461,54
		319,87			505,63
		267,14			418,23
		294,68			496,35
		234,90			405,00
		257,23			552,80
		295,61			482,84
		235,17			494,57
		264,32			511,40
		244,53			495,10
Área média (mV.s)		264,99	Área média (mV.s)		474,68
Desvio Padrão		25,00	Desvio Padrão		40,19
CV %		9,4	CV %		8,5

C5. Ensaios de Exactidão – SPME

A exactidão foi estimada através de ensaios de recuperação. Para a obtenção dos valores experimentais, recorreu-se ao método da adição de padrão. Procedeu-se a extracções individuais de solução padrão, de amostra (extracto de Esteva) e de uma solução mistura em partes iguais (1:1) de padrão e amostra, registando-se as áreas obtidas. Deste modo as eficiências de recuperação (η) foram determinadas de acordo com expressão que se apresenta abaixo, na qual o factor de diluição vale 2.

$$\eta = \frac{\text{área (padrão + amostra)}}{\frac{(\text{área padrão} + \text{área amostra})}{\text{factor de diluição}}} \times 100$$

Foram efectuadas adições padrão a 4 níveis de concentração e os ensaios realizados em duplicado para cada nível de concentração.

Tabela C34. 1º Ensaio de recuperação para o 1º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α -Pineno	100,9	69,45	348,70	169,11	80,9
*Hexanona	25,0	33,25	150,56	83,94	91,3
Linalol	46,0	198,47		96,77	97,5
Borneol	24,9	48,51	172,35	104,89	95,0
α -Terpineol	75,5	128,20		61,12	95,4
Citronelol	30,0	135,64		63,82	94,1
Geraniol	29,7	80,66		37,26	92,4
Ac. Bornilo	10,0	73,45	612,80	322,46	94,0
Eugenol	150,8	116,70		56,04	96,0
Ac. Geranilo	30,0	228,50		121,78	106,6

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C35. 2º Ensaio de recuperação para o 1º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	100,9	73,87	399,74	211,32	89,2
*Hexanona	25,0	30,42	177,15	93,17	89,8
Linalol	46,0	192,38		90,58	94,2
Borneol	24,9	47,23	153,30	93,40	93,1
α-Terpineol	75,5	132,17		65,47	99,1
Citronelol	30,0	140,43		68,38	97,4
Geraniol	29,7	86,63		38,64	89,2
Ac. Bornilo	10,0	75,20	606,87	344,11	100,9
Eugenol	150,8	124,30		59,34	95,5
Ac. Geranilo	30,0	241,80		125,50	103,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C36. 1º Ensaio de recuperação para o 2º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	282,5	215,46	347,35	253,74	90,2
*Hexanona	75,1	105,7	145,47	117,13	93,3
Linalol	76,7	254,80		122,03	95,8
Borneol	74,8	145,63	134,40	147,40	105,3
α-Terpineol	125,8	214,70		105,35	98,1
Citronelol	50,0	243,11		116,14	95,5
Geraniol	69,4	165,58		74,31	89,8
Ac. Bornilo	30,0	197,29	622,70	397,93	97,1
Eugenol	251,4	194,67		95,38	98,0
Ac. Geranilo	50,0	311,36		160,74	103,3

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C37. 2º Ensaio de recuperação para o 2º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	282,5	229,20	372,55	253,26	84,2
*Hexanona	75,1	109,70	160,92	128,90	95,3
Linalol	76,7	274,80		134,36,	97,8
Borneol	74,8	137,50	155,24	157,00	107,3
α-Terpineol	125,8	224,70		112,50	100,1
Citronelol	50,0	238,70		116,42	97,5
Geraniol	69,4	158,80		72,85	91,8
Ac. Bornilo	30,0	208,00	658,31	429,06	99,1
Eugenol	251,4	204,80		102,39	100,0
Ac. Geranilo	50,0	331,70		174,56	105,3

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C38. 1º Ensaio de recuperação para o 3º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	464,0	305,63	329,71	315,07	99,2
*Hexanona	125,2	146,87	149,88	155,45	104,8
Linalol	107,4	405,28		182,90	90,3
Borneol	174,4	395,41	130,24	265,41	101,0
α-Terpineol	176,1	368,90		176,08	95,5
Citronelol	70,1	384,30		218,41	113,7
Geraniol	69,4	164,00		80,36	98,0
Ac. Bornilo	50,0	372,45	678,40	564,52	107,4
Eugenol	352,0	294,68		136,20	92,4
Ac. Geranilo	70,1	496,35		248,51	100,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C39. 2º Ensaio de recuperação para o 3º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	464,0	335,21	302,71	304,35	95,4
*Hexanona	125,2	160,32	140,80	149,36	99,2
Linalol	107,4	423,71		206,64	97,5
Borneol	174,4	380,51	118,23	270,19	108,4
α-Terpineol	176,1	348,70		158,26	90,8
Citronelol	70,1	357,60		187,28	104,7
Geraniol	69,4	159,10		82,05	103,1
Ac. Bornilo	50,0	360,47	658,46	506,48	99,4
Eugenol	352,0	267,14		130,38	97,6
Ac. Geraniol	70,1	478,23		252,17	105,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C40. 1º Ensaio de recuperação para o 4º nível de concentração.

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra	Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	827,2	678,70	321,15	466,90	93,4
*Hexanona	225,4	284,60	175,30	198,85	86,5
Linalol	138,1	601,30		269,71	89,7
Borneol	224,3	550,63	161,72	353,56	99,3
α-Terpineol	226,4	474,32		223,61	94,3
Citronelol	90,1	485,10		253,22	104,4
Geraniol	89,2	245,90		107,75	87,6
Ac. Bornilo	70,1	521,49	647,26	577,86	98,9
Eugenol	452,8	366,80		185,66	101,2
Ac. Geraniol	90,1	659,70		368,54	111,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C41. 2º Ensaio de recuperação para o 4º nível de concentração

Composto	Padrão		Amostra	Padrão+Amostra		Recuperação (%)
	Conc. (µg/L)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	Área (mV.s)	
α-Pineno	827,2	638,13	341,54	483,62		98,7
*Hexanona	225,4	299,52	155,40	215,09		94,6
Linalol	138,1	622,40		299,90		96,4
Borneol	224,3	480,63	140,26	322,99		104,1
α-Terpineol	226,4	445,18		228,60		102,7
Citronelol	90,1	501,50		239,42		95,5
Geraniol	89,2	254,40		125,67		98,8
Ac. Bornilo	70,1	501,89	687,85	557,37		93,7
Eugenol	452,8	391,40		211,94		108,3
Ac. Geraniol	90,1	687,50		360,25		104,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela C42. Recuperação média.

Composto	R ₁ (%)	R ₂ (%)	R ₃ (%)	R ₄ (%)	R ₅ (%)	R ₆ (%)	R ₇ (%)	R ₈ (%)	R _{média} (%)	CV (%)
α-Pineno	80,9	89,2	90,2	84,2	99,2	95,4	93,4	98,7	91,4	7,2
*Hexanona	91,3	89,8	93,3	95,3	104,8	99,2	86,5	94,6	94,4	6,0
Linalol	97,5	94,2	95,8	97,8	90,3	97,5	89,7	96,4	94,9	3,4
Borneol	95,0	93,1	105,3	107,3	101,0	108,4	99,3	104,1	101,7	5,5
α-Terpineol	95,4	99,1	98,1	100,1	95,5	90,8	94,3	102,7	97,0	3,9
Citronelol	94,1	97,4	95,5	97,5	113,7	104,7	104,4	95,5	100,4	6,7
Geraniol	92,4	89,2	89,8	91,8	98,0	103,1	87,6	98,8	93,8	5,9
Ac. Bornilo	94,0	100,9	97,1	99,1	107,4	99,4	98,9	93,7	98,8	4,4
Eugenol	96,0	95,5	98,0	100,0	92,4	97,6	101,2	108,3	98,6	4,8
Ac. Geraniol	106,6	103,8	103,3	105,3	100,1	105,5	111,7	104,8	105,1	3,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

C6. Eficiência de Extração – SPME

A eficiência de extração foi determinada como sendo a razão entre a quantidade máxima a extrair (massa de composto existente em 2 mL de solução padrão) e a quantidade extraída. A quantidade máxima a extrair (identificada na tabela como *massa no vial*) foi calculada conhecendo a concentração dos compostos na solução mistura padrão e o volume de amostra (2 mL) colocado no vial. Através das áreas obtidas para a mistura padrão extraída por SPME, foi possível, recorrendo às curvas de calibração obtidas por injeção directa (ver tabela 15 do capítulo Resultados e Discussão) calcular a quantidade extraída (identificada na tabela como *massa extraída*).

Tabela C43. Eficiência de extração (em %) por SPME.

Composto	Conc. (µg/L)	Massa no vial (ng)	Área (mV.s)	Massa extraída (ng)	Eficiência de extração (%)
α-Pineno	100,9	201,8	65,98	9,2	4,6
	282,5	565,0	219,59	28,2	5,0
	464,0	326,44	326,44	41,5	4,5
	645,6	1291,2	488,34	61,5	4,8
	827,2	1654,4	621,99	78,0	4,7
	1008,8	2017,6	749,87	93,8	4,7
*Hexanona	25,0	50,0	31,33	5,1	10,2
	75,1	150,2	110,75	17,7	11,8
	125,2	250,4	165,99	26,4	10,5
	175,3	350,6	233,38	37,1	10,6
	225,4	450,8	296,16	47,0	10,4
	250,4	500,8	353,41	56,1	11,2
Linalol	15,3	30,6	58,11	8,2	26,8
	46,0	92,0	190,67	25,2	27,4
	76,7	153,4	292,35	38,2	24,9
	107,4	214,8	417,10	54,2	25,2
	138,1	276,2	552,54	71,6	25,9
	153,4	306,8	629,57	81,5	26,6
Borneol	24,9	49,8	50,16	8,1	16,3
	74,8	149,6	155,26	22,2	14,9
	124,6	249,2	269,56	37,5	15,1
	174,4	348,8	375,30	51,7	14,8
	224,3	448,6	479,47	65,6	14,6
	249,2	498,4	539,85	73,7	14,8

Tabela C43. Eficiência de extracção (em %) por SPME. (continuação)

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Massa no vial (ng)	Área (mV.s)	Massa extraída (ng)	Eficiência de extracção (%)
α -Terpineol	25,2	50,4	44,50	7,3	14,5
	75,5	151	134,54	20,9	13,9
	125,8	251,6	229,74	35,3	14,0
	176,1	352,2	336,10	51,4	14,6
	226,4	452,8	427,54	65,3	14,4
	251,6	503,2	475,06	72,4	14,4
Citronelol	10,0	20,0	44,63	7,0	34,8
	30,0	60,0	147,83	22,6	37,6
	50,0	100,0	270,25	41,1	41,1
	70,1	140,2	366,39	55,7	39,7
	90,1	180,2	478,57	72,6	40,3
	100,1	200,2	525,44	79,7	39,8
Geraniol	9,9	19,8	25,99	4,8	24,0
	29,7	59,4	74,30	12,5	21,0
	49,6	99,2	124,68	20,5	20,7
	69,4	138,8	179,57	29,2	21,1
	89,2	178,4	230,74	37,4	21,0
	99,1	198,2	266,83	43,2	21,8
Acetato de Bornilo	10,0	20,0	72,25	11,5	57,6
	30,0	60,0	215,50	33,5	55,9
	50,0	100,0	358,36	55,5	55,5
	70,1	60,0	496,16	33,5	55,9
	90,1	180,2	645,08	99,5	55,2
	100,1	200,2	740,60	114,2	57,0
Eugenol	50,3	100,6	36,86	6,9	6,8
	150,8	301,6	124,74	22,6	7,5
	251,4	502,8	189,34	34,1	6,8
	352,0	704,0	277,59	49,9	7,1
	452,5	905,0	350,91	63,0	7,0
	502,8	1005,6	405,97	72,8	7,2
Acetato de Geranilo	10,0	20,0	64,43	11,7	58,5
	30,0	60,0	217,57	38,4	64,0
	50,0	100,0	335,67	59,0	59,0
	70,1	140,2	486,28	85,3	60,8
	90,1	180,2	624,65	109,4	60,7
	100,1	200,2	705,71	123,5	61,7

Tabela C44. Eficiência média de extração (em %).

Composto	E ₁ (%)	E ₂ (%)	E ₃ (%)	E ₄ (%)	E ₅ (%)	E ₆ (%)	E _{média} (%)	CV (%)
α -Pineno	4,6	5,0	4,5	4,8	4,7	4,6	4,7	3,8
*Hexanona	10,2	11,8	10,5	10,6	10,4	11,2	10,8	5,6
Linalol	26,7	27,4	24,9	25,2	25,9	26,6	26,1	3,7
Borneol	16,3	14,9	15,1	14,8	14,6	14,8	15,1	4,1
α -Terpineol	14,5	13,9	14,0	14,6	14,4	14,4	14,3	2,0
Citronelol	34,9	37,6	41,1	39,7	40,3	39,8	38,9	5,9
Geraniol	23,9	20,9	20,7	21,1	21,0	21,8	21,6	5,6
Ac. Bornilo	57,7	55,9	55,4	54,7	55,2	57,0	56,0	2,1
Eugenol	6,8	7,5	6,8	7,1	7,0	7,2	7,1	3,8
Ac. Geranilo	58,6	64,0	59,0	60,9	60,7	61,7	60,8	3,2

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

ANEXO D

Resultados obtidos para o estudo do processo de extracção SDE

Lista de Tabelas

D1. Preparação da Mistura Padrão usada para o Estudo da Eficiência de Extracção por SDE.....	154
Tabela D1. Concentrações das soluções padrão mãe.....	154
Tabela D2. Concentração da solução padrão usada para o estudo da eficiência de extracção.....	154
D2. Estudo da Influência do Solvente na Eficiência de Extracção por SDE.....	155
Tabela D3. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por pentano.....	155
Tabela D4. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano.....	156
Tabela D5. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano.....	156
Tabela D6. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por hexano.....	157
Tabela D7. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com hexano.....	157
Tabela D8. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente hexano.....	158
Tabela D9. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por ciclohexano.....	158
Tabela D10. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com ciclohexano.....	159
Tabela D11. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente ciclohexano.....	159
Tabela D12. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por éter dietílico.....	160
Tabela D13. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com éter dietílico.....	160
Tabela D14. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente éter dietílico.....	161
Tabela D15. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por mistura de pentano e éter dietílico.....	161
Tabela D16. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção por mistura de pentano e éter dietílico.....	162
Tabela D17. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente uma mistura de pentano e éter dietílico.....	162
D3. Estudo da Influência do Tempo de Extracção na Eficiência de SDE.....	163
Tabela D18. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 30 minutos.....	163
Tabela D19. Valores obtidos por injeção directa dos extractos (tempo de extracção 30 minutos).....	164
Tabela D20. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 30 minutos.....	164
Tabela D21. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 60 minutos.....	165
Tabela D22. Valores obtidos por injeção directa dos extractos (tempo de extracção 60 minutos).....	165
Tabela D23. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 60 minutos.....	166
Tabela D24. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 90 minutos.....	166
Tabela D25. Valores obtidos por injeção directa dos extractos (tempo de extracção 90 minutos).....	167
Tabela D26. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 90 minutos.....	167

Tabela D27. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 120 minutos.	168
Tabela D28. Valores obtidos por injeção directa dos extractos (tempo de extracção 120 minutos)	168
Tabela D29. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 120 minutos.	169
D4. Estudo da Eficiência de Extracção e Avaliação da Reprodutibilidade de SDE.	170
Tabela D30. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por pentano – 2º par de ensaios.	170
Tabela D31. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano-2º par de ensaios.	171
Tabela D32. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano-2º par de ensaios.	171
Tabela D33. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por pentano – 3º par de ensaios.	172
Tabela D34. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano-3º par de ensaios.	172
Tabela D35. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano – 2º par de ensaios.	173
Tabela D36. Eficiência média de extracção usando como solvente pentano (6 ensaios)	173
D5. Estudo da Recuperação de SDE.	174
Tabela D37. Amostras de esteva usadas nos ensaios de recuperação.	174
Tabela D38. Valores obtidos para a extracção de uma amostra de esteva sem adição padrão.	175
Tabela D39. Valores de concentração esperada para os extractos de esteva com adição de padrão.	175
Tabela D40. Valores obtidos para a 1º extracção com adição de padrão – E1	176
Tabela D41. Valores obtidos para a 2º extracção com adição de padrão – E2	176
Tabela D42. Valores obtidos para a 3º extracção com adição de padrão – E3	176
Tabela D43. Recuperação média de extracção	177

D1. Preparação da Mistura Padrão usada para o Estudo da Eficiência de Extração por SDE

As soluções mãe utilizadas foram preparadas do seguinte modo:

1. Solução mãe de ~2500 mg/L: Pesaram-se rigorosamente ~125,0 mg de composto e diluíram-se em etanol, para balão volumétrico de 50 mL.

Tabela D1. Concentrações das soluções padrão mãe.

Composto	Massa (mg)	Conc. (mg/L)
α -Pino	126,1	2522
2,2,6-Trimetilciclohexanona	125,2	2504
Linalol	127,84	2556,8
Borneol	124,6	2492
α -Terpineol	125,78	2515,6
Citronelol	125,1	2502
Geraniol	123,9	2478
Acetato de Bornilo	125,1	2502
Eugenol	125,7	2514
Acetato de Geraniol	125,1	2502

2. A partir das soluções mãe foi preparada uma mistura padrão, em etanol, contendo todos os compostos em estudo em concentração individual de ~100 mg/L

Tabela D2. Concentração da solução padrão usada para o estudo da eficiência de extração.

Composto	Vol (μ L)*	Conc. (mg/L)
α -Pino	1000	100,9
2,2,6-Trimetilciclohexanona	1000	100,2
Linalol	1000	102,3
Borneol	1000	99,7
α -Terpineol	1000	100,6
Citronelol	1000	100,1
Geraniol	1000	99,1
Acetato de Bornilo	1000	100,1
Eugenol	1000	100,6
Acetato de Geraniol	1000	100,1

* Volume de solução padrão mãe medido para balão de 25 mL

D2. Estudo da Influência do Solvente na Eficiência de Extração por SDE

Para avaliação da eficiência do processo de SDE procedeu-se à extração de uma solução aquosa na qual se adicionou 5 mL da solução padrão. Após a extração o extracto final foi recuperado para um balão de 5 mL de capacidade. Deste modo a eficiência de extração foi determinada através do cálculo da razão entre as áreas obtidas por injeção directa dos extractos e as áreas obtidas por injeção directa da solução padrão usada para a extração. Nas tabelas que se seguem apresentam-se as áreas obtidas por injeção directa da solução padrão e dos extractos, as áreas médias e as eficiências médias de extração para os diferentes solventes usados.

Tabela D3. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extração por pentano.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	830,65	846,65	838,65	11,32	1,3
*Hexanona	621,84	635,89	628,86	9,93	1,6
Linalol	772,92	752,93	762,92	14,14	1,9
Borneol	719,33	706,57	712,95	9,02	1,3
α -Terpineol	679,06	699,47	689,26	14,43	2,1
Citronelol	679,33	697,61	688,47	12,92	1,9
Geraniol	586,73	593,75	590,24	4,96	0,8
Acetato de Bornilo	642,10	654,68	648,39	8,89	1,4
Eugenol	552,65	576,18	564,41	16,64	2,9
Acetato de Geranilo	566,55	583,71	575,13	12,13	2,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D4. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano.

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	544,83	516,69	530,76	19,89	3,7	560,81	585,91	573,36	17,75	3,1
*Hexanona	474,39	448,59	461,49	18,24	4,0	479,20	494,25	486,72	10,64	2,2
Linalol	625,15	612,53	618,84	8,93	1,4	654,62	675,89	665,25	15,04	2,3
Borneol	567,97	579,05	573,51	7,83	1,4	606,13	617,89	612,01	8,31	1,4
α -Terpineol	560,78	591,17	575,98	21,49	3,7	529,49	553,10	541,30	16,69	3,1
Citronelol	565,52	542,76	554,14	16,09	2,9	563,33	594,91	579,12	22,32	3,9
Geraniol	479,19	511,84	495,51	23,08	4,7	455,71	480,91	468,31	17,82	3,8
Ac. Bornilo	538,29	563,20	550,74	17,62	3,2	531,47	508,42	519,95	16,30	3,1
Eugenol	411,76	422,53	417,15	7,61	1,8	377,66	399,19	388,43	15,23	3,9
Ac.Geraniol	447,59	426,26	436,93	15,09	3,5	456,16	474,49	465,32	12,96	2,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D5. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	530,76	573,36	838,65	63,3	68,4	65,8	5,5
*Hexanona	461,49	486,72	628,86	73,4	77,4	75,4	3,8
Linalol	618,84	665,25	762,92	81,1	87,2	84,2	5,1
Borneol	573,51	612,01	712,95	80,4	85,8	83,1	4,6
α -Terpineol	575,98	541,30	689,26	83,6	78,5	81,0	4,4
Citronelol	554,14	579,12	688,47	80,5	84,1	82,3	3,1
Geraniol	495,51	468,31	590,24	84,0	79,3	81,6	4,0
Ac. Bornilo	550,74	519,95	648,39	84,9	80,2	82,6	4,1
Eugenol	417,15	388,43	564,41	73,9	68,8	71,4	5,0
Ac.Geraniol	436,93	465,32	575,13	76,0	80,9	78,4	4,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D6. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por hexano.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	790,51	823,76	807,13	23,51	2,9
*Hexanona	665,39	645,02	655,21	14,41	2,2
Linalol	787,15	826,36	806,75	27,73	3,4
Borneol	751,57	761,88	756,72	7,29	1,0
α -Terpineol	704,41	675,36	689,88	20,54	3,0
Citronelol	690,68	665,18	677,93	18,03	2,7
Geraniol	587,40	608,11	597,76	14,65	2,5
Acetato de Bornilo	653,02	638,48	645,75	10,28	1,6
Eugenol	557,37	539,78	548,57	12,44	2,3
Acetato de Geraniol	513,05	527,99	520,52	10,57	2,0

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D7. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com hexano.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
	1º Extracto					2º Extracto				
α -Pineno	449,29	433,30	441,30	11,31	2,6	472,12	481,50	476,81	6,63	1,4
*Hexanona	422,70	444,00	433,35	15,06	3,5	458,11	474,11	466,11	11,32	2,4
Linalol	611,03	617,57	614,30	4,62	0,8	635,77	654,14	644,95	12,99	2,0
Borneol	545,96	525,94	535,95	14,16	2,6	583,84	575,49	579,66	5,90	1,0
α -Terpineol	527,64	560,31	543,97	23,10	4,2	525,26	508,26	516,76	12,02	2,3
Citronelol	467,39	490,38	478,88	16,26	3,4	498,23	515,26	506,75	12,04	2,4
Geraniol	441,93	444,17	443,05	1,59	0,4	433,45	416,07	424,76	12,29	2,9
Ac. Bornilo	501,81	468,63	485,22	23,46	4,8	501,95	520,92	511,44	13,42	2,6
Eugenol	368,30	382,88	375,59	10,32	2,7	343,44	362,00	352,72	13,13	3,7
Ac. Geraniol	369,85	387,39	378,62	12,40	3,3	418,59	403,18	410,89	10,90	2,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D8. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente hexano.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	441,30	476,81	807,13	54,7	59,1	56,9	5,5
*Hexanona	433,35	466,11	655,21	66,1	71,1	68,6	5,2
Linalol	614,30	644,95	806,75	76,1	79,9	78,0	3,4
Borneol	535,95	579,66	756,72	70,8	76,6	73,7	5,5
α -Terpineol	543,97	516,76	689,88	78,9	74,9	76,9	3,6
Citronelol	478,88	506,75	677,93	70,6	74,7	72,7	4,0
Geraniol	443,05	424,76	597,76	74,1	71,1	72,6	3,0
Ac. Bornilo	485,22	511,44	645,75	75,1	79,2	77,2	3,7
Eugenol	375,59	352,72	548,57	68,5	64,3	66,4	4,4
Ac.Geraniol	378,62	410,89	520,52	72,7	78,9	75,8	5,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D9. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por ciclohexano.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	816,32	795,28	805,80	14,87	1,8
*Hexanona	653,19	669,80	661,49	11,74	1,8
Linalol	806,40	773,78	790,09	23,06	2,9
Borneol	749,00	723,87	736,44	17,77	2,4
α -Terpineol	675,62	689,73	682,67	9,98	1,5
Citronelol	636,35	627,95	632,15	5,94	0,9
Geraniol	626,37	623,94	625,15	1,71	0,3
Acetato de Bornilo	646,15	636,69	641,42	6,69	1,0
Eugenol	554,09	520,96	537,52	23,43	4,4
Acetato de Geraniol	553,31	539,31	546,31	9,90	1,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D10. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com ciclohexano.

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	439,01	416,41	427,71	15,98	3,7	406,99	397,88	402,44	6,45	1,6
*Hexanona	418,02	446,40	432,21	20,07	4,6	420,60	402,76	411,68	12,61	3,1
Linalol	560,21	589,69	574,95	20,85	3,6	621,37	594,85	608,11	18,75	3,1
Borneol	471,97	506,93	489,45	24,72	5,1	533,17	521,48	527,33	8,27	1,6
α -Terpineol	530,55	516,27	523,41	10,09	1,9	495,51	483,05	489,28	8,81	1,8
Citronelol	410,86	413,53	412,19	1,88	0,5	456,84	432,29	444,56	17,36	3,9
Geraniol	435,26	412,28	423,77	16,25	3,8	451,28	433,77	442,52	12,38	2,8
Ac. Bornilo	424,56	442,39	433,47	12,60	2,9	457,12	464,06	460,59	4,91	1,1
Eugenol	371,19	350,68	360,93	14,50	4,0	337,39	352,20	344,79	10,47	3,0
Ac.Geraniol	405,58	393,39	399,49	8,61	2,2	365,48	371,12	368,30	3,99	1,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D11. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente ciclohexano.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	427,71	402,44	805,80	53,1	49,9	51,5	4,3
*Hexanona	432,21	411,68	661,49	65,3	62,2	63,8	3,4
Linalol	574,95	608,11	790,09	72,8	77,0	74,9	4,0
Borneol	489,45	527,33	736,44	66,5	71,6	69,0	5,3
α -Terpineol	523,41	489,28	682,67	76,7	71,7	74,2	4,8
Citronelol	412,19	444,56	632,15	65,2	70,3	67,8	5,3
Geraniol	423,77	442,52	625,15	67,8	70,8	69,3	3,1
Ac. Bornilo	433,47	460,59	641,42	67,6	71,8	69,7	4,3
Eugenol	360,93	344,79	537,52	67,1	64,1	65,6	3,2
Ac.Geraniol	399,49	368,30	546,31	73,1	67,4	70,3	5,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D12. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por éter dietílico.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	832,65	774,88	803,76	40,85	5,1
*Hexanona	635,89	611,89	623,89	16,97	2,7
Linalol	752,93	717,59	735,26	24,99	3,4
Borneol	716,57	695,19	705,88	15,11	2,1
α -Terpineol	705,47	680,76	693,11	17,47	2,5
Citronelol	697,61	677,03	687,32	14,55	2,1
Geraniol	593,75	590,96	592,35	1,98	0,3
Acetato de Bornilo	654,68	692,29	673,49	26,60	3,9
Eugenol	576,18	531,88	554,03	31,32	5,7
Acetato de Geranilo	583,71	553,62	568,67	21,28	3,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D13. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com éter dietílico.

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	458,58	480,41	469,49	15,44	3,3	513,54	492,23	502,89	15,07	3,0
*Hexanona	440,51	432,95	436,73	5,34	1,2	469,92	464,25	467,08	4,01	0,9
Linalol	576,33	597,99	587,16	15,31	2,6	652,46	638,70	645,58	9,73	1,5
Borneol	634,26	606,25	620,26	19,81	3,2	566,85	594,60	580,73	19,62	3,4
α -Terpineol	579,45	561,75	570,60	12,52	2,2	546,51	523,51	535,01	16,26	3,0
Citronelol	564,63	583,64	574,13	13,44	2,3	558,50	534,49	546,49	16,98	3,1
Geraniol	475,02	505,75	490,38	21,73	4,4	447,75	471,30	459,52	16,65	3,6
Ac. Bornilo	528,36	543,87	536,11	10,97	2,0	562,78	593,07	577,92	21,42	3,7
Eugenol	360,59	380,10	370,35	13,79	3,7	416,17	392,72	404,44	16,58	4,1
Ac. Geranilo	474,32	493,65	483,98	13,67	2,8	457,01	445,73	451,37	7,98	1,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D14. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente éter dietílico.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pino	469,49	502,89	803,76	58,4	62,6	60,5	4,9
*Hexanona	436,73	467,08	623,89	70,0	74,9	72,4	4,7
Linalol	587,16	645,58	735,26	79,9	87,8	83,8	6,7
Borneol	620,26	580,73	705,88	87,9	82,3	85,1	4,7
α -Terpineol	570,60	535,01	693,11	82,3	77,2	79,8	4,6
Citronelol	574,13	546,49	687,32	83,5	79,5	81,5	3,5
Geraniol	490,38	459,52	592,35	82,8	77,6	80,2	4,6
Ac. Bornilo	536,11	577,92	673,49	79,6	85,8	82,7	5,3
Eugenol	370,35	404,44	554,03	66,8	73,0	69,9	6,2
Ac.Geraniol	483,98	451,37	568,67	85,1	79,4	82,2	4,9

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D15. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção por mistura de pentano e éter dietílico.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pino	816,32	796,30	806,31	14,15	1,8
*Hexanona	643,19	656,49	649,84	9,41	1,4
Linalol	826,40	815,09	820,74	7,99	1,0
Borneol	719,00	703,44	711,22	11,01	1,5
α -Terpineol	675,62	682,67	679,15	4,99	0,7
Citronelol	686,35	667,15	676,75	13,58	2,0
Geraniol	636,37	620,15	628,26	11,46	1,8
Acetato de Bornilo	666,15	656,42	661,28	6,88	1,0
Eugenol	584,09	557,52	570,80	18,78	3,3
Acetato de Geraniol	563,31	556,31	559,81	4,95	0,9

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D16. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção por mistura de pentano e éter dietílico.

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α-Pineno	418,58	403,52	411,05	10,65	2,6	424,54	443,77	434,15	13,59	3,1
*Hexanona	480,51	459,84	470,18	14,61	3,1	449,92	429,33	439,62	14,55	3,3
Linalol	615,33	643,85	629,59	20,17	3,2	672,46	690,06	681,26	12,45	1,8
Borneol	544,26	515,31	529,79	20,48	3,9	566,85	557,59	562,22	6,55	1,2
α-Terpineol	549,45	523,19	536,32	18,57	3,5	581,51	555,10	568,30	18,67	3,3
Citronelol	530,63	556,28	543,46	18,14	3,3	578,50	595,82	587,16	12,25	2,1
Geraniol	515,02	492,59	503,80	15,86	3,1	547,75	525,09	536,42	16,03	3,0
Ac. Bornilo	488,36	502,20	495,28	9,79	2,0	522,78	539,37	531,07	11,73	2,2
Eugenol	425,59	410,75	418,17	10,50	2,5	445,17	441,08	443,12	2,89	0,7
Ac.Geranilo	414,32	401,98	408,15	8,72	2,1	452,01	431,46	441,74	14,53	3,3

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D17. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente uma mistura de pentano e éter dietílico.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α-Pineno	411,05	434,15	806,31	51,0	53,8	52,4	3,9
*Hexanona	470,18	439,62	649,84	72,4	67,7	70,0	4,7
Linalol	629,59	681,26	820,74	76,7	83,0	79,9	5,6
Borneol	529,79	562,22	711,22	74,5	79,1	76,8	4,2
α-Terpineol	536,32	568,30	679,15	79,0	83,7	81,3	4,1
Citronelol	543,46	587,16	676,75	80,3	86,8	83,5	5,5
Geraniol	503,80	536,42	628,26	80,2	85,4	82,8	4,4
Ac. Bornilo	495,28	531,07	661,28	74,9	80,3	77,6	4,9
Eugenol	418,17	443,12	570,80	73,3	77,6	75,4	4,1
Ac.Geranilo	408,15	441,74	559,81	72,9	78,9	75,9	5,6

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

D3. Estudo da Influência do Tempo de Extração na Eficiência de SDE

O procedimento utilizado para avaliação da influência do tempo de extração na eficiência do processo de SDE foi idêntico ao já descrito em D2. Procedeu-se, de igual modo, à extração de uma solução aquosa na qual se adicionou 5 mL da solução padrão. Após a extração o extracto final foi recuperado para um balão de 5 mL de capacidade. Deste modo a eficiência de extração foi determinada através do cálculo da razão entre as áreas obtidas por injeção directa dos extractos e as áreas obtidas por injeção directa da solução padrão usada para a extração. Nas tabelas que se seguem apresentam-se as áreas obtidas por injeção directa da solução padrão e dos extractos, as áreas médias e as eficiências médias para os diferentes tempos de extração estudados.

Tabela D18. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extração de 30 minutos.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	701,63	723,69	712,66	15,60	2,2
*Hexanona	667,69	664,86	666,27	2,00	0,3
Linalol	743,58	760,71	752,15	12,11	1,6
Borneol	740,72	766,74	753,73	18,40	2,4
α -Terpineol	665,87	642,34	654,10	16,64	2,5
Citronelol	641,98	675,70	658,84	23,84	3,6
Geraniol	591,55	581,96	586,76	6,78	1,2
Acetato de Bornilo	647,02	671,29	659,16	17,16	2,6
Eugenol	552,21	537,07	544,64	10,70	2,0
Acetato de Geranilo	560,85	533,52	547,18	19,33	3,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D19. Valores obtidos por injeção directa dos extractos. (tempo de extracção 30 minutos)

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	451,02	453,46	452,24	1,72	0,4	469,71	480,90	475,30	7,92	1,7
*Hexanona	489,98	463,48	476,73	18,74	3,9	488,70	498,98	493,84	7,27	1,5
Linalol	603,16	580,95	592,05	15,70	2,7	646,30	637,90	642,10	5,94	0,9
Borneol	595,85	558,88	577,36	26,14	4,5	588,46	612,30	600,38	16,86	2,8
α -Terpineol	516,43	502,43	509,43	9,89	1,9	492,61	477,05	484,83	11,01	2,3
Citronelol	506,72	487,80	497,26	13,38	2,7	525,09	507,77	516,43	12,25	2,4
Geraniol	426,61	427,33	426,97	0,51	0,1	465,96	441,72	453,84	17,14	3,8
Ac. Bornilo	549,58	556,95	553,26	5,21	0,9	570,05	591,10	580,58	14,88	2,6
Eugenol	308,13	324,24	316,19	11,40	3,6	306,40	290,43	298,41	11,29	3,8
Ac.Geranilo	408,07	399,64	403,86	5,96	1,5	436,05	444,84	440,44	6,22	1,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D20. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 30 minutos.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	452,24	475,30	712,66	63,5	66,7	65,1	3,5
*Hexanona	476,73	493,84	666,27	71,6	74,1	72,8	2,5
Linalol	592,05	642,10	752,15	78,7	85,4	82,0	5,7
Borneol	577,36	600,38	753,73	76,6	79,7	78,1	2,8
α -Terpineol	509,43	484,83	654,10	77,9	74,1	76,0	3,5
Citronelol	497,26	516,43	658,84	75,5	78,4	76,9	2,7
Geraniol	426,97	453,84	586,76	72,8	77,3	75,1	4,3
Ac. Bornilo	553,26	580,58	659,16	83,9	88,1	86,0	3,4
Eugenol	316,19	298,41	544,64	58,1	54,8	56,4	4,1
Ac.Geranilo	403,86	440,44	547,18	73,8	80,5	77,2	6,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D21. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extração de 60 minutos.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	830,65	846,65	838,65	11,32	1,3
*Hexanona	621,84	635,89	628,86	9,93	1,6
Linalol	772,92	752,93	762,92	14,14	1,9
Borneol	719,33	706,57	712,95	9,02	1,3
α -Terpineol	679,06	699,47	689,26	14,43	2,1
Citronelol	679,33	697,61	688,47	12,92	1,9
Geraniol	586,73	593,75	590,24	4,96	0,8
Acetato de Bornilo	642,10	654,68	648,39	8,89	1,4
Eugenol	552,65	576,18	564,41	16,64	2,9
Acetato de Geranilo	566,55	583,71	575,13	12,13	2,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D22. Valores obtidos por injeção directa dos extractos. (tempo de extração 60 minutos)

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	544,83	516,69	530,76	19,89	3,7	560,81	585,91	573,36	17,75	3,1
*Hexanona	474,39	448,59	461,49	18,24	4,0	479,20	494,25	486,72	10,64	2,2
Linalol	625,15	612,53	618,84	8,93	1,4	654,62	675,89	665,25	15,04	2,3
Borneol	567,97	579,05	573,51	7,83	1,4	606,13	617,89	612,01	8,31	1,4
α -Terpineol	560,78	591,17	575,98	21,49	3,7	529,49	553,10	541,30	16,69	3,1
Citronelol	565,52	542,76	554,14	16,09	2,9	563,33	594,91	579,12	22,32	3,9
Geraniol	479,19	511,84	495,51	23,08	4,7	455,71	480,91	468,31	17,82	3,8
Ac. Bornilo	538,29	563,20	550,74	17,62	3,2	531,47	508,42	519,95	16,30	3,1
Eugenol	411,76	422,53	417,15	7,61	1,8	377,66	399,19	388,43	15,23	3,9
Ac. Geranilo	447,59	426,26	436,93	15,09	3,5	456,16	474,49	465,32	12,96	2,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D23. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 60 minutos.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	530,76	573,36	838,65	63,3	68,4	65,8	5,5
*Hexanona	461,49	486,72	628,86	73,4	77,4	75,4	3,8
Linalol	618,84	665,25	762,92	81,1	87,2	84,2	5,1
Borneol	573,51	612,01	712,95	80,4	85,8	83,1	4,6
α -Terpineol	575,98	541,30	689,26	83,6	78,5	81,0	4,4
Citronelol	554,14	579,12	688,47	80,5	84,1	82,3	3,1
Geraniol	495,51	468,31	590,24	84,0	79,3	81,6	4,0
Ac. Bornilo	550,74	519,95	648,39	84,9	80,2	82,6	4,1
Eugenol	417,15	388,43	564,41	73,9	68,8	71,4	5,0
Ac.Geraniol	436,93	465,32	575,13	76,0	80,9	78,4	4,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D24. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 90 minutos.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	802,58	830,78	816,68	19,94	2,4
*Hexanona	643,31	661,86	652,59	13,11	2,0
Linalol	785,18	777,09	781,13	5,72	0,7
Borneol	735,45	719,83	727,64	11,05	1,5
α -Terpineol	654,73	685,79	670,26	21,96	3,3
Citronelol	671,04	697,70	684,37	18,86	2,8
Geraniol	607,66	599,06	603,36	6,08	1,0
Acetato de Bornilo	653,61	668,61	661,11	10,61	1,6
Eugenol	556,06	564,95	560,51	6,29	1,1
Acetato de Geraniol	556,45	576,78	566,62	14,37	2,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D25. Valores obtidos por injeção directa dos extractos. (tempo de extracção 90 minutos)

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	496,30	523,10	509,70	18,95	3,7	482,21	495,65	488,93	9,50	1,9
*Hexanona	488,02	503,93	495,98	11,25	2,3	542,57	521,12	531,85	15,17	2,9
Linalol	676,56	696,01	686,29	13,75	2,0	641,79	659,93	650,86	12,83	2,0
Borneol	632,57	630,18	631,37	1,69	0,3	604,57	613,36	608,96	6,22	1,0
α -Terpineol	538,16	552,01	545,08	9,79	1,8	491,62	526,84	509,23	24,90	4,9
Citronelol	567,89	575,46	571,67	5,35	0,9	579,63	552,41	566,02	19,24	3,4
Geraniol	497,90	501,09	499,50	2,26	0,5	479,78	508,46	494,12	20,28	4,1
Ac. Bornilo	564,63	593,67	579,15	20,54	3,5	550,13	536,44	543,28	9,68	1,8
Eugenol	415,32	430,44	422,88	10,69	2,5	459,75	432,51	446,13	19,26	4,3
Ác.Geraniolo	438,11	456,11	447,11	12,73	2,8	457,05	477,32	467,18	14,33	3,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D26. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 90 minutos.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	509,70	488,93	816,68	62,4	59,9	61,1	2,9
*Hexanona	495,98	531,85	652,59	76,0	81,5	78,8	4,9
Linalol	686,29	650,86	781,13	87,9	83,3	85,6	3,7
Borneol	631,37	608,96	727,64	86,8	83,7	85,2	2,6
α -Terpineol	545,08	509,23	670,26	81,3	76,0	78,7	4,8
Citronelol	571,67	566,02	684,37	83,5	82,7	83,1	0,7
Geraniol	499,50	494,12	603,36	82,8	81,9	82,3	0,8
Ac. Bornilo	579,15	543,28	661,11	87,6	82,2	84,9	4,5
Eugenol	422,88	446,13	560,51	75,4	79,6	77,5	3,8
Ac.Geraniolo	447,11	467,18	566,62	78,9	82,5	80,7	3,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D27. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência para um tempo de extracção de 120 minutos.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	809,22	838,88	824,05	20,97	2,5
*Hexanona	645,85	653,61	649,73	5,49	0,8
Linalol	815,64	835,20	825,42	13,83	1,7
Borneol	718,67	735,49	727,08	11,89	1,6
α -Terpineol	674,05	676,40	675,22	1,66	0,2
Citronelol	669,89	640,16	655,02	21,03	3,2
Geraniol	624,41	622,34	623,37	1,46	0,2
Acetato de Bornilo	647,21	633,96	640,58	9,36	1,5
Eugenol	559,22	537,03	548,12	15,69	2,9
Acetato de Geranilo	566,57	557,57	562,07	6,36	1,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D28. Valores obtidos por injeção directa dos extractos. (tempo de extracção 120 minutos)

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	404,03	427,98	416,00	16,93	4,1	432,25	463,61	447,93	22,17	4,9
*Hexanona	551,50	525,92	538,71	18,09	3,4	509,66	493,10	501,38	11,71	2,3
Linalol	657,09	674,81	665,95	12,53	1,9	672,97	704,33	688,65	22,17	3,2
Borneol	610,65	612,97	611,81	1,64	0,3	595,82	592,66	594,24	2,24	0,4
α -Terpineol	539,80	574,14	556,97	24,28	4,4	519,66	540,83	530,24	14,97	2,8
Citronelol	501,60	529,25	515,43	19,55	3,8	511,21	541,52	526,37	21,44	4,1
Geraniol	469,50	495,53	482,51	18,41	3,8	498,64	535,02	516,83	25,73	5,0
Ac. Bornilo	518,04	540,01	529,02	15,53	2,9	528,75	546,78	537,77	12,75	2,4
Eugenol	405,63	418,25	411,94	8,93	2,2	434,02	453,08	443,55	13,48	3,0
Ac. Geranilo	417,56	446,57	432,06	20,51	4,7	425,90	460,68	443,29	24,60	5,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D29. Eficiência média obtida para um tempo de extracção de 120 minutos.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	Eficiência Média %	CV (%)
α -Pineno	416,00	447,93	824,05	50,5	54,4	52,4	5,2
*Hexanona	538,71	501,38	649,73	82,9	77,2	80,0	5,1
Linalol	665,95	688,65	825,42	80,7	83,4	82,1	2,4
Borneol	611,81	594,24	727,08	84,1	81,7	82,9	2,1
α -Terpineol	556,97	530,24	675,22	82,5	78,5	80,5	3,5
Citronelol	515,43	526,37	655,02	78,7	80,4	79,5	1,5
Geraniol	482,51	516,83	623,37	77,4	82,9	80,2	4,9
Ac. Bornilo	529,02	537,77	640,58	82,6	83,9	83,3	1,2
Eugenol	411,94	443,55	548,12	75,2	80,9	78,0	5,2
Ac.Geranilo	432,06	443,29	562,07	76,9	78,9	77,9	1,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

D4. Estudo da Eficiência de Extração e Avaliação da Reprodutibilidade de SDE

Após a definição das condições de extração por SDE (solvente pentano e tempo de extração de 60 minutos), procedeu-se ao estudo de reprodutibilidade do processo extractivo através da determinação da eficiência média de extração para seis ensaios executados nas mesmas condições. O processo de cálculo usado para determinar as eficiências de extração está descrito na secção D2. Os dois primeiros ensaios executados encontram-se também na secção D2, tabelas D3 a D5. Apresentam-se nas tabelas seguintes os resultados relativos aos restantes ensaios.

Tabela D30. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extração por pentano – 2º par de ensaios.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	802,84	867,57	835,21	45,77	5,5
*Hexanona	648,08	632,82	640,45	10,79	1,7
Linalol	796,61	782,68	789,64	9,85	1,2
Borneol	743,42	725,03	734,22	13,01	1,8
α -Terpineol	673,58	701,25	687,42	19,56	2,8
Citronelol	663,92	698,87	681,40	24,71	3,6
Geraniol	612,19	589,67	600,93	15,92	2,6
Acetato de Bornilo	655,46	637,69	646,58	12,57	1,9
Eugenol	548,03	567,93	557,98	14,07	2,5
Acetato de Geranilo	541,77	569,94	555,85	19,92	3,6

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D31. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano-2° par de ensaios.

Composto	Área (mV.s) 1° Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2° Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	560,76	540,85	550,80	14,08	2,6	513,36	489,21	501,28	17,08	3,4
*Hexanona	460,49	480,90	470,70	14,43	3,1	504,72	492,65	498,69	8,54	1,7
Linalol	628,84	652,20	640,52	16,51	2,6	670,25	689,24	679,75	13,43	2,0
Borneol	598,51	618,10	608,30	13,85	2,3	638,01	677,05	657,53	27,61	4,2
α -Terpineol	545,98	537,15	541,56	6,24	1,2	581,30	601,01	591,15	13,94	2,4
Citronelol	554,14	532,44	543,29	15,34	2,8	525,12	496,32	510,72	20,36	4,0
Geraniol	495,51	469,69	482,60	18,26	3,8	480,31	509,10	494,71	20,36	4,1
Ac. Bornilo	550,74	537,26	544,00	9,54	1,8	501,95	515,67	508,81	9,71	1,9
Eugenol	365,15	376,45	370,80	7,99	2,2	414,43	443,19	428,81	20,34	4,7
Ac.Geraniol	422,93	430,94	426,94	5,67	1,3	460,32	439,49	449,91	14,73	3,3

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D32. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano-2° par de ensaios.

Composto	Área Média 1° Extracto (mV.s)	Área Média 2° Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1° Extracto %	Eficiência 2° Extracto %	CV (%)
α -Pineno	550,80	501,28	835,21	65,9	60,0	6,7
*Hexanona	470,70	498,69	640,45	73,5	77,9	4,1
Linalol	640,52	679,75	789,64	81,1	86,1	4,2
Borneol	608,30	657,53	734,22	82,9	89,6	5,5
α -Terpineol	541,56	591,15	687,42	78,8	86,0	6,2
Citronelol	543,29	510,72	681,40	79,7	75,0	4,4
Geraniol	482,60	494,71	600,93	80,3	82,3	1,8
Ac. Bornilo	544,00	508,81	646,58	84,1	78,7	4,7
Eugenol	370,80	428,81	557,98	66,5	76,9	10,3
Ac.Geraniol	426,94	449,91	555,85	76,8	80,9	3,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D33. Valores obtidos por injeção directa da solução padrão usada para avaliar a eficiência de extracção com pentano – 3º par de ensaios.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	840,20	799,74	819,97	28,61	3,5
*Hexanona	616,03	641,31	628,67	17,87	2,8
Linalol	781,90	738,82	760,36	30,46	4,0
Borneol	718,53	709,96	714,25	6,06	0,8
α -Terpineol	667,91	703,53	685,72	25,18	3,7
Citronelol	670,14	692,95	681,55	16,13	2,4
Geraniol	576,61	616,14	596,38	27,95	4,7
Acetato de Bornilo	663,35	653,77	658,56	6,77	1,0
Eugenol	540,84	580,33	560,58	27,92	5,0
Acetato de Geranilo	568,07	579,00	573,54	7,73	1,3

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D34. Valores obtidos por injeção directa dos extractos resultantes da extracção com pentano – 3º par de ensaios.

Composto	Área (mV.s) 1º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)	Área (mV.s) 2º Extracto		Área Média (mV.s)	Desvio Padrão	CV (%)
α -Pineno	518,72	495,22	506,97	16,62	3,3	569,20	553,36	561,28	11,20	2,0
*Hexanona	442,36	455,20	448,78	9,08	2,0	516,03	498,31	507,17	12,53	2,5
Linalol	636,30	599,66	617,98	25,91	4,2	681,90	629,80	655,85	36,84	5,6
Borneol	588,33	557,92	573,13	21,50	3,8	648,53	614,68	631,61	23,94	3,8
α -Terpineol	586,64	571,73	579,19	10,54	1,8	557,91	556,53	557,22	0,98	0,2
Citronelol	566,38	543,02	554,70	16,52	3,0	567,14	591,80	579,47	17,44	3,0
Geraniol	479,69	486,93	483,31	5,12	1,1	526,61	516,25	521,43	7,33	1,4
Ac. Bornilo	564,47	570,10	567,28	3,98	0,7	493,35	509,00	501,17	11,07	2,2
Eugenol	373,58	390,03	381,80	11,64	3,0	400,84	390,01	395,43	7,66	1,9
Ac. Geranilo	419,52	446,17	432,85	18,85	4,4	473,07	503,16	488,12	21,28	4,4

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D35. Valores obtidos para a eficiência de extracção usando como solvente pentano – 3º par de ensaios.

Composto	Área Média 1º Extracto (mV.s)	Área Média 2º Extracto (mV.s)	Área Média Sol. Padrão (mV.s)	Eficiência 1º Extracto %	Eficiência 2º Extracto %	CV (%)
α -Pineno	506,97	561,28	819,97	61,8	68,5	7,2
*Hexanona	448,78	507,17	628,67	71,4	80,7	8,6
Linalol	617,98	655,85	760,36	81,3	86,3	4,2
Borneol	573,13	631,61	714,25	80,2	88,4	6,9
α -Terpineol	579,19	557,22	685,72	84,5	81,3	2,7
Citronelol	554,70	579,47	681,55	81,4	85,0	3,1
Geraniol	483,31	521,43	596,38	81,0	87,4	5,4
Ac. Bornilo	567,28	501,17	658,56	86,1	76,1	8,8
Eugenol	381,80	395,43	560,58	68,1	70,5	2,5
Ac.Geraniolo	432,85	488,12	573,54	75,5	85,1	8,5

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

Tabela D36. Eficiência média de extracção usando como solvente pentano. (6 ensaios)

Composto	E1 %	E2 %	E3 %	E4 %	E5 %	E6 %	Eficiência média %	CV (%)
α -Pineno	63,3	68,4	65,9	60,0	61,8	68,5	64,7	5,4
*Hexanona	73,4	77,4	73,5	77,9	71,4	80,7	75,7	4,6
Linalol	81,1	87,2	81,1	86,1	81,3	86,3	83,8	3,5
Borneol	80,4	85,8	82,9	89,6	80,2	88,4	84,6	4,7
α -Terpineol	83,6	78,5	78,8	86,0	84,5	81,3	82,1	3,7
Citronelol	80,5	84,1	79,7	75,0	81,4	85,0	81,0	4,4
Geraniol	84,0	79,3	80,3	82,3	81,0	87,4	82,4	3,6
Ac. Bornilo	84,9	80,2	84,1	78,7	86,1	76,1	81,7	4,9
Eugenol	73,9	68,8	66,5	76,9	68,1	70,5	70,8	5,5
Ac.Geraniolo	76,0	80,9	76,8	80,9	75,5	85,1	79,2	4,8

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

D5. Estudo da Recuperação de SDE

Para avaliação da exactidão do método extractivo e da eventual existência de efeito de matriz realizaram-se ensaios de recuperação. Para o efeito procedeu-se inicialmente à extracção de uma amostra de esteva, tendo o extracto obtido sido analisado por SPME/GC-FID para determinação da concentração dos compostos identificados. Posteriormente procedeu-se à extracção de uma amostra de esteva tendo sido adicionado 5 mL de uma solução padrão contendo os compostos em estudo em concentrações diferenciadas. Foram realizadas 3 extracções com adição de padrão à amostra de esteva. Os extractos obtidos foram analisados por SPME/GC-FID. A recuperação foi então determinada como sendo a razão entre a concentração obtida (amostra+padrão) e a concentração esperada (amostra+padrão) para um recuperação de 100%.

Encontram-se na tabela D37 as massas de amostra utilizadas nos 4 ensaios, estes valores não são no entanto necessários para os cálculos. Na tabela D38 estão os resultados obtidos na análise do extracto de esteva sem adição de padrão. Estes resultados permitiram avaliar a concentração de padrão a adicionar nos ensaios posteriores e a consequente determinação da concentração esperada para os ensaios com adição de padrão. Apresentam-se na tabela de D39 os valores de concentração esperada para os extractos com adição de padrão. As tabelas D40 a D42 reúnem os resultados obtidos para os ensaios com adição padrão. A recuperação média obtida é apresentada na tabela D43.

Tabela D37. Amostras de esteva usadas nos ensaios de recuperação.

Amostra de esteva (mg)			
Extracção sem adição padrão	Extracção com adição padrão		
	E1	E2	E3
15009,3	15012,8	15009,6	15024,1

Tabela D38. Valores obtidos para a extracção de uma amostra de esteva sem adição padrão.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	357,21	330,39	343,80	5,5	464,6	371,7
*Hexanona	187,76	170,19	178,98	6,9	131,7	105,4
Linalol						
Borneol	127,75	111,72	119,73	9,5	57,2	45,8
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	523,34	587,26	555,30	8,1	76,7	61,4
Eugenol						
Ac. Geraniol						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a - Concentração do extracto = 0,8 x Conc.vial

Tabela D39. Valores de concentração esperada para os extractos de esteva com adição de padrão.

Composto	Conc. Padrão (mg/L)	m _{pc} (mg)	m _c (mg)	m _{esp} (mg)	Conc. esperada Extracto (mg/L)
α-Pineno	201,76	1008,8	3717,0	4725,8	472,6
*Hexanona	50,00	250	1054,0	1304,0	130,4
Linalol	204,54	1022,7		1022,7	102,3
Borneol	199,36	996,8	458,0	1454,8	145,4
α-Terpineol	201,24	1006,2		1006,2	100,6
Citronelol	150,12	750,6		750,6	75,1
Geraniol	148,68	743,4		743,4	74,3
Ac. Bornilo	25,02	125,1	614,0	739,1	73,9
Eugenol	201,12	1005,6		1005,6	100,6
Ac. Geraniol	150,12	750,6		750,6	75,1

m_{pc} – massa de padrão adicionadam_c – massa de composto determinada no extracto antes da adição padrão (vol. de extracto 10 mL)m_{esp} – massa esperada = m_{pc} + m_c

Tabela D40. Valores obtidos para a 1ª extração com adição de padrão – E1.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	313,01	301,06	307,03	2,8	415,8	332,6
*Hexanona	152,91	169,89	161,40	7,4	118,8	95,0
Linalol	424,42	396,93	410,68	4,7	102,7	82,2
Borneol	353,07	311,87	332,47	8,8	155,0	124,0
α-Terpineol	185,61	170,87	178,24	5,8	96,6	77,3
Citronelol	368,72	402,06	385,39	6,1	73,3	58,6
Geraniol	176,79	196,42	186,61	7,4	71,4	57,1
Ac. Bornilo	561,28	602,33	581,81	5,0	80,4	64,3
Eugenol	68,86	75,43	72,14	6,4	94,0	75,2
Ac. Geraniolo	538,45	490,66	514,55	6,6	73,9	59,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela D41. Valores obtidos para a 2ª extração com adição de padrão – E2.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	280,19	296,92	288,56	4,1	391,2	313,0
*Hexanona	171,22	183,70	177,46	5,0	130,6	104,5
Linalol	421,30	459,99	440,65	6,2	110,1	88,1
Borneol	295,47	330,32	312,89	7,9	146	116,8
α-Terpineol	178,01	162,30	170,16	6,5	92,4	73,9
Citronelol	383,52	425,76	404,64	7,4	76,8	61,4
Geraniol	176,76	164,16	170,46	5,2	65,3	52,2
Ac. Bornilo	605,69	663,59	634,64	6,5	87,6	70,1
Eugenol	71,43	63,47	67,45	8,3	88,2	70,6
Ac. Geraniolo	460,13	508,71	484,42	7,1	69,6	55,7

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela D42. Valores obtidos para a 3ª extração com adição de padrão – E3.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	350,94	381,86	366,40	6,0	494,6	395,7
*Hexanona	184,52	206,42	195,47	7,9	143,8	115,0
Linalol	465,46	504,80	485,13	5,7	121,1	96,9
Borneol	434,98	385,51	410,24	8,5	190,7	152,6
α-Terpineol	184,83	207,35	196,09	8,1	105,9	84,7
Citronelol	380,06	348,93	364,49	6,0	69,4	55,5
Geraniol	184,18	211,37	197,77	9,7	75,6	60,5
Ac. Bornilo	505,62	561,55	533,58	7,4	73,8	59,0
Eugenol	73,84	83,80	78,82	8,9	102,4	81,9
Ac. Geraniolo	591,77	627,79	609,78	4,2	87,4	69,9

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela D43. Recuperação média de extracção

Composto	R _{E1} %	R _{E2} %	R _{E3} %	Recuperação média %	Desvio padrão	CV (%)
α -Pineno	70,4	66,2	83,7	73,4	9,1	12,4
*Hexanona	72,9	80,1	88,2	80,4	7,7	9,5
Linalol	80,4	86,1	94,7	87,1	7,2	8,3
Borneol	85,3	80,3	105,0	90,2	13,1	14,5
α -Terpineol	76,8	73,5	84,2	78,2	5,5	7,0
Citronelol	78,0	81,8	73,9	77,9	4,0	5,1
Geraniol	76,9	70,3	81,4	76,2	5,6	7,3
Ac. Bornilo	87,0	94,9	79,8	87,2	7,6	8,7
Eugenol	74,8	70,2	81,4	75,5	5,6	7,5
Ac.Geraniolo	78,7	74,2	93,1	82,0	9,9	12,1

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

ANEXO E

Resultados da Análise dos extractos de Esteva por SPME/GC-FID

Lista de Tabelas

E1. Resultados da Análise por SPME/GC-FID dos extractos de Esteva obtidos por SDE.....	180
--	-----

Tabela E1. Amostras de esteva usadas nos ensaios de extracção por SDE.....	180
---	-----

Tabela E2. Valores obtidos para a 1º extracção – E1	180
--	-----

Tabela E3. Valores obtidos para a 2º extracção – E2.....	181
---	-----

Tabela E4. Valores obtidos para a 3º extracção – E3.....	181
---	-----

Tabela E5. Valores obtidos para a 4º extracção – E4.....	181
---	-----

Tabela E6. Valores obtidos para a 5º extracção – E5.....	182
---	-----

Tabela E7. Valores obtidos para a 6º extracção – E6.....	182
---	-----

Tabela E8. Concentrações médias para os compostos identificados nos extractos (6 ensaios).....	182
---	-----

E1. Resultados da Análise por SPME/GC-FID dos extractos de Esteva obtidos por SDE

Foram realizadas seis extracções, nas mesmas condições, a partir de amostras de Esteva. Na tabela E1 encontram-se as quantidades de amostra de Esteva utilizadas na extracção. Nas tabelas de E2 a E6 encontram-se reunidos os resultados obtidos na análise dos extractos por SPME/GC-FID. Para a quantificação dos compostos nos extractos foi utilizado um factor de diluição de 800x.

Tabela E1. Amostras de esteva usadas nos ensaios de extracção por SDE.

Ensaio de Extracção	Amostra de esteva (mg)
E1	14897,4
E2	15066,8
E3	14959,6
E4	14997,6
E5	14986,3
E6	14990,4

Tabela E2. Valores obtidos para a 1ª extracção – E1.

Composto	Área		Área Média	CV	Conc. vial	Conc. Extracto ^a
	(mV.s)		(mV.s)	(%)	(µg/L)	(mg/L)
α-Pineno	294,37	320,98	307,67	6,1	416,6	333,3
*Hexanona	185,60	196,08	190,84	3,9	140,4	112,3
Linalol						
Borneol	134,05	116,80	125,42	9,7	59,8	47,8
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	674,23	641,87	658,05	3,5	90,8	72,6
Eugenol						
Ac. Geraniolo						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a - Concentração do extracto = 0,8 x Conc.vial

Tabela E3. Valores obtidos para a 2ª extracção – E2.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc. vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	311,79	336,69	324,24	5,4	438,6	350,9
*Hexanona	195,44	209,44	202,44	4,9	148,9	119,1
Linalol						
Borneol	135,91	150,19	143,05	7,1	67,9	54,3
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	651,62	632,36	641,99	2,1	88,6	70,9
Eugenol						
Ac. Geraniol						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela E4. Valores obtidos para a 3ª extracção – E3.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc. vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	361,51	396,76	379,13	6,6	511,5	409,2
*Hexanona	178,28	190,57	184,42	4,7	135,7	108,6
Linalol						
Borneol	119,67	105,94	112,80	8,6	54,0	43,2
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	526,26	566,38	546,32	5,2	75,5	60,4
Eugenol						
Ac. Geraniol						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela E5. Valores obtidos para a 4ª extracção – E4.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc. vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	439,20	394,82	417,01	7,5	561,8	449,4
*Hexanona	165,65	189,27	177,46	9,4	130,6	104,5
Linalol						
Borneol	135,73	121,65	128,69	7,7	61,3	49,0
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	590,89	528,04	559,46	7,9	77,3	61,8
Eugenol						
Ac. Geraniol						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela E6. Valores obtidos para a 5^o extração – E5.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc. vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	362,72	378,68	370,70	3,0	500,3	400,2
*Hexanona	169,92	157,42	163,67	5,4	120,5	96,4
Linalol						
Borneol	140,93	161,27	151,10	9,5	71,6	57,3
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	684,88	607,85	646,37	8,4	89,2	71,4
Eugenol						
Ac. Geranilo						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela E7. Valores obtidos para a 6^o extração – E6.

Composto	Área (mV.s)		Área Média (mV.s)	CV (%)	Conc. vial (µg/L)	Conc. Extracto ^a (mg/L)
α-Pineno	380,65	392,83	386,74	2,2	521,6	417,3
*Hexanona	181,01	192,20	186,61	4,2	137,3	109,8
Linalol						
Borneol	154,28	174,91	164,59	8,9	77,8	62,2
α-Terpineol						
Citronelol						
Geraniol						
Ac. Bornilo	653,94	700,14	677,04	4,8	93,4	74,7
Eugenol						
Ac. Geranilo						

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona

a – Concentração do extracto=0,8 x Conc.vial

Tabela E8. Concentrações médias para os compostos identificados nos extractos. (6 ensaios)

Composto	Conc. E1 (mg/L)	Conc. E2 (mg/L)	Conc. E3 (mg/L)	Conc. E4 (mg/L)	Conc. E5 (mg/L)	Conc. E6 (mg/L)	Conc. média (mg/L)	CV (%)
α-Pineno	333,3	350,8	409,2	449,5	400,2	417,3	393,4	11,0
*Hexanona	112,4	119,1	108,6	104,5	96,4	109,8	108,5	7,0
Linalol								
Borneol	47,9	54,3	43,2	49,0	57,2	62,2	52,3	13,2
α-Terpineol								
Citronelol								
Geraniol								
Ac. Bornilo	72,6	70,9	60,4	61,8	71,4	74,7	68,6	8,7
Eugenol								
Ac. Geranilo								

* 2,2,6 - Trimetilciclohexanona



FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000068481